ANTONIO FRANCISCO DE SOUZA FILHO

**Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em
rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil**

São Paulo

2019

ANTONIO FRANCISCO DE SOUZA FILHO

Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

São Paulo

2019

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. 3779
FMVZ

Souza Filho, Antonio Francisco de
Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil / Antonio Francisco de Souza Filho. – 2019.
68 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann.

1. Tuberculose bovina. 2. Tipagem. 3. *Spoligotyping*. 4. VNTR-MIRU. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Genetic diversity of Mycobacterium bovis isolates in cattle from different regions of Brazil", protocol number CEUAX 8909280515 (ID 000278), under the responsibility Marcos Bryan Heinemann, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day July 01, 2015.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Diversidade genética de isolados de Mycobacterium bovis em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil ", protocolado sob o CEUAX nº 8909280515, sob a responsabilidade de Marcos Bryan Heinemann, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 01 de julho de 2015.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA FILHO, Antonio Francisco de

Título: Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre incentivar e apoiar, mesmo que isso acarretasse minha ausência em momentos tão importantes;

Ao meu orientador, professor Marcos, pela paciência, pelas orientações, incentivos, oportunidades, confiança e ensinamentos oferecidos;

À Raquel Mineko Matsuda pela feliz oportunidade que tenho de fazer parte da sua vida e você da minha, por me acompanhar durante essa etapa e sempre se fazer presente, independentemente do tempo e da distância;

À Gisele Oliveira de Souza minha eterna gratidão por a cada dia me receber com sorriso e entusiasmo necessário, mesmo frente as maiores adversidades, por compartilhar seus conhecimentos, técnicas e momentos de sabedoria e por sempre me mostrar o caminho para enfrentar toda dificuldade encontrada...a fé;

À Juliana Aiwaza Porto de Abreu por em tão pouco tempo se tornar eternamente responsável por aquilo que cativamos....nossa amizade;

À Cassia Leal pela amizade e pelas palavras necessárias ditas nos momentos que eu mais precisava;

À Katia Oliveira de Souza, Sheila Oliveira de Souza e Sueli Akemi pelos bons momentos e ensinamentos;

À Adriana Cortez pelas dicas e confiança na elaboração e orientação de trabalhos;

À equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas: professor José Soares, Zenaide Moraes, Lilian Abigail, Juliana Castro, Israel Guedes, Cassia Ykuta, Eleine Anzai, Osvaldo Inlamea, Danubia Fontana, Nicolás Céspedes e Nairléia Silva pelos ensinamentos e momentos compartilhados no LZB;

À Dra María Laura Boschioli e demais membros da *Unité Zoonoses Bacteriennes* do *Laboratoire de Santé Animale* da *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail*, em Maison-Alfort, França, de modo especial Krystel da Cruz, Lorraine Michelet, Jennifer Tambosco e Sylvie Hénault, pela acolhida, paciência e todos ensinamentos compartilhados;

À equipe do Laboratório de Pesquisa Avançada em Micobactérias, principalmente professora Ana Márcia Guimaraões e Cristina Zimpel, pelos ensinamentos de Bioinformática e colaborações.

Aos amigos do VPS, de modo especial Marcos Gomes, Bruna Farias, Daniela Chiebao, Solange Oliveira, Igor Acosta, Herbert Soares, Maria Carolina Serpa, Hilda Pena, Ana Beatriz Cassinelli, Amália Barbieri, Mara Gravinatti, Yara Cledes, Lina Binder e Laila Bezerra.

Aos amigos de Campo Grande: Alice Oliveira, Paulo Braz, Nathália Messas, Renan Porto, Welington Oliveira, Denner Santos, Nathália Albuquerque, Marjorie Comparim e Alexandre Lima;

À equipe do laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan, Dra Ana Lucia Tablet, Luis Guilherme e Aline Teixeira. A Dra Patricia Abreu do Laboratório de Bacteriologia, também do Instituto Butantan. Professor Marcio Garcia, Marilia Franco e Carmen Bolaños da UNESP de Botucatu. Ao Tiago Tomazi, Bruno Miotto e Amane Paldês por me permitir aprender ajudando;

Aos funcionários e professores do VPS por compartilharem momentos e ensinamentos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de doutorado (Processo 1540453) e pela bolsa pelo Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (Processo 88881.134576/2016-01).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

RESUMO

SOUZA FILHO, A. F. **Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil**. 2019. 68 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tuberculose bovina é uma doença causada pelo *Mycobacterium bovis* que afeta, principalmente, bovinos e búfalos. Para compreender melhor a distribuição da tuberculose bovina no país o presente trabalho teve como objetivo proceder a caracterização molecular de isolados de *M. bovis* de diferentes regiões do Brasil. No total 289 isolados provenientes de 11 estados brasileiros foram genotipados pelas técnicas de *Spoligotyping* e VNTR-MIRU com 24 marcadores diferentes, sendo o primeiro estudo com isolados de diferentes regiões do Brasil caracterizados por meio dessas técnicas. Foram identificados 42 espoligotipos e os perfis SB0121, SB0295, SB1380, SB0140 e SB1050 foram os mais frequentes, além disso três novos espoligotipos foram descritos. Por meio da técnica de VNTR-MIRU 173 perfis distintos foram caracterizados, mostrando alta diversidade desse agente no Brasil. Os marcadores com maior diversidade alélica foram: ETR-A, QUB11b, MIRU 16, MIRU 27, ETR-B, ETR-C, Mtub21 e QUB 26, sugerindo esse conjunto de marcadores capaz de caracterizar os isolados de *M. bovis* no Brasil.

Palavras-chave: Tuberculose bovina. Tipagem. *Spoligotyping*. VNTR-MIRU.

ABSTRACT

SOUZA FILHO, A. F. **Genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolates in cattle herds from different regions of Brazil.** 2019. 68 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bovine tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium bovis* that mainly affects cattle and buffalo. To better understand the distribution of bovine tuberculosis in the country, the present work aimed to characterize the molecular isolates of *M. bovis* from different regions of Brazil. In total, 289 isolates from 11 Brazilian states were genotyped by the *Spoligotyping* and VNTR-MIRU with 24 different markers, being the first study with isolates from different regions of Brazil characterized by these techniques. Forty-two spoligotypes were identified and the profiles SB0121, SB0295, SB1380, SB0140 and SB1050 were the most frequent, in addition three new spoligotypes were described. Through the VNTR-MIRU technique 173 distinct profiles were characterized, showing high diversity of this agent in Brazil. The markers with the highest allelic diversity were: ETR-A, QUB11b, MIRU 16, MIRU 27, ETR-B, ETR-C, Mtub21 and QUB 26, suggesting this set of markers capable of characterizing *M. bovis* isolates in Brazil.

Keywords: Bovine tuberculosis. Typing. Spoligotypin. VNTR-MIRU

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dendograma com os 10 perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de amostras <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Mato Grosso, ano de isolamento, cidade de origem e propriedade e espoligotipos	37
Figura 2 - MST com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de amostras de <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Mato Grosso. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)	38
Figura 3 - Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Mato Grosso, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos	39
Figura 4 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras de <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Mato Grosso. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)	40
Figura 5 – Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de amostras <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Santa Catarina, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos.....	41
Figura 6 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de amostras de <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Santa Catarina. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)	42
Figura 7 – Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Santa Catarina, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos.....	43
Figura 8 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras de <i>M. bovis</i> isolados de bovinos no estado de Santa Catarina. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)	44
Figura 9 – Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de amostras <i>M. bovis</i> isolados de bovinos nos estados de Paraíba e Pernambuco, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos	45
Figura 10 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de 289 isolados de <i>M. bovis</i> provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um espoligotipo identificado	46

Figura 11 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica <i>Spoligotyping</i> de 289 isolados de <i>M. bovis</i> provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um estado brasileiro.....	48
Figura 12 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de 289 isolados de <i>M. bovis</i> provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um espoligotipo identificado	50
Figura 13 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de 289 isolados de <i>M. bovis</i> provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um estado brasileiro.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência da tuberculose bovina nos estados brasileiros	18
Tabela 2 – Identificação, localização e sequência dos 26 marcadores utilizados na genotipagem, por meio da técnica de VNTR-MIRU, de isolados de diferentes regiões do Brasil	30
Tabela 3 – Reagentes, concentrações e volumes utilizando na preparação de mix de PCR para genotipagem pela técnica de VNTR-MIRU com os marcadores 3232 e QUB-11a	32
Tabela 4 – Reagentes, concentrações e volumes utilizando na preparação de mix de PCR para genotipagem pela técnica de <i>Spoligotyping</i> - Luminex	33
Tabela 5 – Temperaturas e tempos empregados na amplificação utilizada na técnica de <i>Spoligotyping</i> - Luminex	33
Tabela 6 – Distribuição da quantidade de isolados de <i>M. bovis</i> , cidades, propriedades e perfis obtidos pelas técnicas de <i>Spoligotyping</i> e VNTR-MIRU em quatro estados brasileiros	36
Tabela 7 – Três novos espoligotipo identificados no presente estudo	36
Tabela 8 – Distribuição dos 289 isolados de <i>M. bovis</i> de acordo com o estado, quantidade de isolados, espoligotipos e perfis de VNTR-MIRU identificados	46
Tabela 9 – Distribuição e diversidade alélica dos <i>loci</i> VNTR-MIRU dos 289 isolados de <i>M. bovis</i> , provenientes de 11 estados brasileiros	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença causada pelo *Mycobacterium bovis* que afeta, principalmente, bovinos e búfalos. Nos bovinos, a doença causa lesões em diversos órgãos e tecidos, como pulmões, fígado e baço. A doença gera diversos prejuízos ao produtor, como queda na produção de leite, perdas na produção de carne e a perda referente à condenação de carcaças com lesões de tuberculose no abatedouro, além de representar uma barreira não-tarifária ao livre comércio de animais e produtos de origem animal.

No Brasil, a tuberculose bovina é mais prevalente em rebanhos de leite, especialmente em fazenda de alta produção. Em estudos conduzidos em 13 unidades federativas do Brasil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal), que compreende 75% do rebanho brasileiro, foram observados que a tuberculose bovina é heterogênea dentro e entre os estados. As maiores prevalências foram observadas no estado do Espírito Santo, norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e sudeste de Goiás. Nesses estados a produção de leite foi identificada como maior fator de risco para a doença, assim como o grau de tecnificação no sistema de produção e alta quantidade de animais no rebanho. A principal fonte de infecção é a introdução de animais doentes no rebanho, que pode ser facilmente solucionado com testes diagnósticos.

Atualmente, por meio da epidemiologia molecular, que utiliza diversas técnicas de biologia molecular, temos a possibilidade de identificar as diferentes fontes de infecção. A genotipagem tornou-se uma ferramenta valiosa em estudos epidemiológicos de *M. bovis*, permitindo aos investigadores detectar fontes de infecção e alcançar um conhecimento mais amplo sobre a transmissão da tuberculose. Além disso, em combinação com dados espaciais, destaca a distribuição geográfica de estirpes de *M. bovis* em estudo aumentando o conhecimento da dinâmica de transmissão do patógeno e auxilia nos programas de controle.

Dentre as técnicas utilizadas para a tipagem molecular de *M. bovis*, duas recorrem à amplificação pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem como marcador epidemiológico,

mas com potencial polimorfismo para diferenciar estirpes sem relação epidemiológica entre si: *Spoligotyping* e VNTR-MIRU (*Variable Number Tandem Repeats - Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*).

Para compreender melhor a dinâmica de transmissão da tuberculose bovina no Brasil, monitorar a circulação e distribuição de *M. bovis* nos locais estudados e assim contribuir com o Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, além de melhorar o entendimento do agente e da doença, o estudo visa realizar as análises genéticas e epidemiológicas a partir de dados de genotipagem de isolados de *M. bovis* de diferentes localidades do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Proceder a caracterização molecular de isolados de *M. bovis* de diferentes regiões do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar tipagem molecular de isolados de *M. bovis* por meio das técnicas de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR.
- Calcular o poder de discriminação de cada técnica.
- Analisar a relação genética entre os isolados de *M. bovis*.
- Selecionar os marcadores genéticos com maior poder de discriminação.
- Identificar agrupamentos entre os isolados de acordo com a região de origem.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* e faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que é composto por espécies estreitamente relacionadas: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. suricattae*, “dassie bacillus” e “chimpanzee bacillus”. *M. canettii* também é considerado membro do complexo devido sua similaridade genética, no entanto esse agente é ambiental e as infecções em humanos são ocasionais (BRITES et al., 2018).

M. bovis são cocobacilos medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento. São microerófilos, não flagelados, não esporulados, não capsulados nem formadores de toxina. As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), isto é, quando corados pela fucsina a quente resistem à descoloração com álcool-ácido – coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (CORNER, 1994).

M. bovis é um patógeno que habita preferencialmente o meio intracelular de fagócitos mononucleares e, como as demais micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, é hospedeiro-dependente e não pode multiplicar-se no meio ambiente. Porém, são capazes de se reproduzir *in vitro*. As espécies do gênero *Mycobacterium* spp. crescem em meios especiais compostos de ovo e amido, enriquecidos com asparagina e contendo verde malaquita para inibir contaminantes. O glicerol dificulta o crescimento de *M. bovis*, mas favorece o crescimento de todos os outros microrganismos do gênero. Desse modo, *M. bovis* cresce muito melhor na presença de piruvato como fonte de carbono (KEATING et al., 2005). Em meios de cultura à base de ovo, é típico o crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular. As micobactérias também crescem em meios à base de ágar; nestes as colônias são brancas, finas, ásperas e planas, exceto no centro onde são mais volumosas (CORNER, 1994). Micobactérias do complexo *M. tuberculosis* encontram condições ideais de multiplicação em animais de sangue quente, aproximadamente 37 °C e pH neutro (BARRERA, 2007). De acordo com a OIE, *M. bovis* é classificado como um

patógeno de risco três para a saúde pública cujo risco individual é alto e para a comunidade é limitado (THOEN; LOBUE; DE KANTOR, 2006).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, mas a prevalência é maior em países em desenvolvimento onde o conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitados (REVIRIEGO GORDEJO; VERMEERSCH, 2006). Entre os anos 2015 e 2016, dos 179 países que relataram a situação epidemiológica da doença, mais da metade notificaram a presença da doença em animais de produção e/ou silvestres (OMS; OIE; FAO, 2017) .

No Brasil, a tuberculose bovina é mais prevalente em rebanhos de leite, especialmente em fazenda de alta produção. Em estudos conduzidos em 13 unidades federativas do Brasil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal), que compreende 75% do rebanho brasileiro, foram observados que a tuberculose bovina é heterogênea dentro e entre os estados, sendo que a prevalência entre os animais varia entre 0,035% e 1,3% (Tabela 1) (FERREIRA NETO et al., 2016).

Tabela 1 - Prevalência da tuberculose bovina nos estados brasileiros

Estado	Prevalência (Rebanhos) - %	Prevalência (Animais) – %	Referência
Bahia	1,6	0,21	(BAHIENSE et al., 2016)
Distrito Federal	0,36	0,05	(RIBEIRO et al., 2016)
Goiás	3,43	0,3	(CARVALHO et al., 2016)
Espírito Santo	7,6	0,7	(GALVIS et al., 2016)
Mato Grosso	1,3	0,12	(NÉSPOLI et al., 2016)
Mato Grosso do Sul	1,3	0,035	(GUEDES et al., 2016)
Minas Gerais	4,25	0,56	(BARBIERI et al., 2016)
Paraná	2,15	0,42	(SILVA et al., 2016)
Pernambuco	2,87	0,62	(LIMA et al., 2016)
Rio Grande do Sul	2,8	0,7	(QUEIROZ et al., 2016)
Rondônia	2,3	0,12	(VENDRAME et al., 2016)
Santa Catarina	0,5	0,06	(VELOSO et al., 2016)
São Paulo	9	1,3	(DIAS et al., 2016)

Fonte: SOUZA-FILHO(2019).

A tuberculose tem sido relatada em uma variedade de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo os primatas e espécies exóticas de vida livre ou de cativeiro. *M. bovis* é mais frequentemente isolado a partir de bovinos domesticados

embora possa ser recuperado de outros bovídeos e demais mamíferos. O isolamento da micobactéria a partir de diferentes hospedeiros demonstra a dispersão de estirpes em um hospedeiro alternativo ou a ampliação da preferência por espécies hospedeiras (SMITH et al., 2006a, 2006b)

As vias pelas quais os bovinos são infectados são influenciadas por diversos fatores como a idade, o meio ambiente e as práticas de manejo adotadas (NEILL et al., 1994). A transmissão da tuberculose bovina pela via respiratória é facilitada pela convivência natural, em especial em rebanhos com alta densidade animal e substancial movimento deles dentro da propriedade, e por meio de eventos agropecuários. A distribuição das lesões tuberculosas encontradas em bovinos que foram naturalmente infectados mostra que 80-90% desses animais são infectados por esta via (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). Isso porque um único bacilo transportado no interior de uma gotícula é suficiente para estabelecer a infecção no pulmão do bovino (DEAN et al., 2005).

Importante ressaltar que, esses bacilos não são excretados apenas por bovinos com lesões pulmonares abertas, mas também por animais no período inicial da infecção (MODA et al., 1996). Além dos aerossóis produzidos na respiração, gotículas produzidas pela eructação durante a ruminação de pastos contaminados e partículas de poeira, embora sejam menos comuns, também tem sido destacada como rotas alternativas de infecção pela via aerógena (BIET et al., 2005). O animal infectado pode disseminar o agente por descarga nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginal e uterina, e pelo sêmen (POLLOCK; NEILL, 2002).

A ocorrência de tuberculose humana causada por *M. bovis* normalmente é resultado da frequente ingestão de leite não pasteurizado e produtos cárneos crus contaminados, sendo que não há registros de infecção humana a partir de uma fonte ambiental direta (BIET et al., 2005). No entanto, também pode ser decorrente do manuseio do leite ou de carcaças provenientes de bovinos tuberculosos, assumindo, nesses casos, um caráter ocupacional (ABRAHÃO, 1998).

As micobactérias são sensíveis à pasteurização, à fervura e à incidência de luz solar direta em ambiente seco. Desinfetantes fenólicos, formólicos, álcool e hipoclorito de sódio são eficientes no combate ao bacilo, mas sua ação pode ser afetada pela concentração do produto, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica. Os bacilos podem permanecer viáveis no solo por cerca de seis meses; na água por até um ano, no pasto por até dois anos, nas fezes por quatro a

cinco meses e nos produtos de origem animal por até 10 meses (O'REILLY; DABORN, 1995; ROXO, 1997; PHILLIPS et al., 2003).

3.3 Exame bacteriológico

O padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose é o isolamento da micobactéria em meio de cultivo e a sua identificação. Entretanto, as micobactérias patogênicas crescem lentamente (em até 90 dias, ou mais). A qualidade do meio de cultura, da descontaminação da amostra e das condições de incubação aliados ao fato de algumas amostras conterem apenas um pequeno número de bacilos vivos também pode comprometer o sucesso do isolamento (DE ARAÚJO et al., 2005; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012; MEDEIROS et al., 2012).

Para processar amostras para a cultura, o tecido é homogeneizado e descontaminado com detergente (como cloreto de hexadecilpiridínio, hidróxido de sódio ou ácido oxálico) (OIE, 2009; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012; MEDEIROS et al., 2012). Para o isolamento primário, o sedimento geralmente é inoculado em meios a base de ovo e amido, enriquecidos com asparagina. O meio Lowenstein Jensen é utilizado para o cultivo de micobactérias, principalmente da espécie *Mycobacterium tuberculosis*. Para a espécie *M. bovis* o Stonebrink é o mais recomendado, pois essa espécie tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio, (CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012). Meios à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue, como o meio de Middlebrook modificado ou 7H11 e o meio ágar sangue tuberculose ou B83, também são indicados (COUSINS, FRANCIS; GOW, 1989; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012). As culturas são incubadas por um período mínimo de oito semanas (e de preferência por 10-12 semanas), a 37 °C, com ou sem CO₂. Os meios de cultura devem estar em tubos hermeticamente fechados para evitar a dessecação. Durante o período de incubação, buscam-se sinais de crescimento macroscópico, em intervalos diários ou a cada 2-3 dias. Quando o crescimento é visível, são preparados esfregaços corados pela técnica de Ziehl Neelsen (OIE, 2009).

O fator limitante no isolamento, muitas vezes, é a má qualidade das amostras apresentadas e todo esforço deve ser feito para assegurar que o laboratório receba amostras de boa qualidade. Padrões de crescimento e morfologia colonial

característica podem fornecer um diagnóstico presuntivo de *M. bovis*. No entanto, cada isolado deve ser identificado. O modelo característico de crescimento e a morfologia colonial em meios de cultura podem formular um diagnóstico preliminar de infecção por *M. bovis*. Tais colônias podem ser identificadas por meio de provas bioquímicas ou por técnicas de biologia molecular (OIE, 2009).

As provas bioquímicas podem ser utilizadas para confirmar o agente causal da doença. Essas provas caracterizam as micobactérias por diferenças bioquímicas apresentadas entre as espécies, tais como o acúmulo de niacina, redução de nitrato a nitrito, produção de catalase, entre outras. Estes testes apresentam alta especificidade, porém é trabalhosa, requer cultura nova, pura e abundante, condição só alcançada após sucessivos repiques a partir do primo isolamento, que pode se estender por vários meses até a confirmação da espécie (CORNER, 1994; BRASIL, 2006; MICHEL; MULLER; van HELDEN, 2010).

3.4 GENOMA DE *M. bovis*

O agente *M. bovis* possui 4.345.492 pb (pares de base) em seu genoma, organizado em um único cromossoma circular com conteúdo médio de guanina e citosina de 65,63%. Contém 3.952 genes, incluindo um profago e 42 elementos de inserção (insertion sequence -IS) (GARNIER et al., 2003). O genoma de *M. bovis* é >99,95% geneticamente idêntico ao *M. tuberculosis*, mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. As diferenças são observadas na variação nas redes de expressão gênica, fundamentais para muitas diferenças fenotípicas entre os bacilos da tuberculose humana e bovina. As paredes celulares das bactérias patogênicas mostram uma variação nas sequências de proteínas e na composição macromolecular, levando a uma pressão seletiva sobre estas estruturas. O maior grau de variação entre as sequências dos bacilos bovino e humano é encontrado em genes que codificam proteínas da parede celular e as proteínas secretoras que podem estar relacionadas com a virulência, adesão e modulação imunológica, além do tropismo tecidual e de hospedeiro. Apesar da similaridade genética com *M. tuberculosis*, o genoma do *M. bovis* tem sido reduzido devido a deleções, eventos considerados unidirecionais nessas bactérias (GARNIER et al., 2003).

3.5 Epidemiologia molecular

Smith et al. (2003) descreveram a população de *M. bovis* como sendo uma população de estrutura irregular e não uniforme, que consiste em uma série de grandes e pequenos complexos clonais. Complexos clonais são definidos como grupos de cepas descendentes de uma única célula que foi o ancestral comum mais recente desse complexo clonal, e que apresenta todas as características derivadas do ancestral comum mais recente (Europa 1, Europa 2, África 1, África 2) (SMITH, 2012). Para as bactérias, que não apresenta a sua diversidade limitada pela reprodução sexuada, a diversidade genética pode ser decorrente de eventos como a recombinação genética, translocações, duplicações ou inversões. No entanto, foi observado que nos membros do MTBC não houve nenhuma troca de material genético entre linhagens (SMITH et al., 2011).

As baixas taxas de homoplasias (mutações idênticas em diferentes linhagens) e a congruência entre os diferentes marcadores moleculares encontrados a partir de reconstruções filogenéticas dos membros do MTBC foram observadas como uma consequência de clonalidade (COMAS et al., 2009). Isso é esperado em um organismo clonal porque as homoplasias só podem ser geradas por recombinação de material genético entre diferentes linhagens ou por eventos independentes, como mutações repetidas no mesmo locus. A baixa diversidade de sequências dentro do MTBC sugere que homoplasias causadas por mutações repetidas não são susceptíveis de serem observadas, a não ser que o locus esteja evoluindo sob alguma forma de pressão seletiva, por exemplo, genes que conferem resistência a antibióticos, ou se um evento de mutação gerar alelos similares em diferentes linhagens (loci VNTR) (SMITH, 2012). A alta frequência com que alguns clones se originam na população pode ser explicada, principalmente, pela seleção. No entanto, a irregularidade observada na estrutura global da população de *M. bovis* e o domínio de clones individuais poderiam ser o resultado de um efeito fundador recente, ou seja, um clone sendo introduzido em um novo habitat e multiplicando-se na ausência de competição. Se todas as cepas tivessem oportunidades iguais de sobrevivência, então a estrutura da população em geral seria relativamente uniforme, com poucas divisões filogenéticas (SMITH et al., 2003).

Os primeiros estudos filogenéticos de micobactérias foram realizados inicialmente com base em similaridades fenotípicas. O gene 16S RNA foi o primeiro,

e durante muitos anos, o único alvo de sequenciamento genético em bactérias. Sua função essencial na síntese de proteínas tem estado presente em todos os organismos desde o início da evolução (PEIX, RAMIREZ-BAHENA; VELAZQUEZ, 2009). Marcadores fenotípicos como a susceptibilidade micobacteriana ao fago e o padrão de resistência a drogas (antibióticos) eram usados para distinguir cepas, mas somente a fagotipagem fornecia uma limitada diferenciação de cepas micobacterianas, sendo que o antibiograma era útil apenas para detectar resistências de cepas a drogas de modo que o uso para investigações epidemiológicas era restrito (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

Um salto qualitativo ocorreu a partir da década de 60, com o progresso do conhecimento genético e mais recentemente com a criação de bancos de dados de domínio público, que armazenam em tempo real, sequências genéticas em toda parte do globo (TORTOLI, 2012). A partir da década de 1990 protocolos de tipificação foram padronizados para melhorar as possibilidades de investigações epidemiológicas (van EMBDEN et al., 1993; COUSINS et al., 1998; RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012). Após a conclusão do sequenciamento do genoma completo da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, foi possível realizar comparações *in silico* do genoma, e a partir daí identificar diversos marcadores genômicos que pudessem contribuir com a análise evolutiva e com estudos epidemiológicos acerca dos membros do complexo *M. tuberculosis* (SALES, 2012). 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 (SUPPLY et al., 2003).

A capacidade dos sistemas de tipagem molecular para distinguir entre isolados é um reflexo da variação genética observada no DNA cromossômico de uma espécie bacteriana (SWAMINATHAN; MATAR, 1993). Os métodos de genotipagem moleculares mais comuns recorrem à amplificação por PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem de marcador epidemiológico, mas com potencial polimorfismo para diferenciar cepas sem relação epidemiológica entre si (DUARTE et al., 2007).

A maioria das técnicas de genotipagem usadas para diferenciação de cepas do complexo *M. tuberculosis* podem ser classificadas em duas categorias, as técnicas que baseiam em todo o genoma ou técnicas que se baseiam em

sequências do genoma (DURR; CLIFTON-HADLEY; HEWINSON, 2000). Técnicas com todo o genoma foram as primeiras descritas e possuem a vantagem de obter todas as potenciais informações genéticas. No entanto, esses métodos, incluindo a análise de restrição de endonucleases (REA) e a eletroforese em campo pulsado (PFGE) são tecnicamente exigentes, difíceis de automatizar e, portanto, menos populares que técnicas que envolvem parte do genoma. As técnicas de sequências do genoma incluem técnicas de sequências repetidas específicas que compreendem as sequências de inserção (IS), as regiões de repetições diretas (DR), e os loci de repetições em sequência (RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012).

As técnicas mais utilizadas para tipagem molecular de membros do complexo *M. tuberculosis* são: i. polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism – RFLP-*IS6110*), ii. *Spoligotyping* e iii. VNTR-MIRU (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; DUARTE et al., 2007; COLLINS, 2011).

3.5.1 RFLP-IS6110

Um método de tipagem altamente discriminatório, baseado na variação da sequência de DNA no genoma bacteriano, denominado RFLP-*IS6110* é amplamente utilizado no estudo epidemiológico da tuberculose. Este método baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição, denominadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos. Os fragmentos são então separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA. A sequência mais utilizada para o estudo epidemiológico da tuberculose é a *IS6110* (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; COLLINS, 2011).

A diferença na localização e número de cópias desta sequência de inserção é a origem do polimorfismo entre isolados. Na espécie *M. tuberculosis* o número de cópias na sequência de inserção *IS6110* é geralmente muito elevado, sendo maior que vinte e cinco cópias (DEVALLOIS et al., 1998). Isto confere um elevado poder de discriminação desta técnica. Em contraste, a maioria dos isolados de *M. bovis* possui baixo número de cópias de *IS6110*, sendo o máximo de oito cópias encontradas em isolados (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; COLLINS, 2011). Esta é a razão pela qual RFLP- *IS6110* ainda é a técnica de referência para

identificar *M. tuberculosis*, enquanto oferece pouco interesse para a maioria dos isolados *M. bovis* (KAMERBEEK et al., 1997). Berg et al. (2011)(BERG et al., 2011) hipotetizaram que a associação de *M. bovis* com baixo número de cópias se deve ao fato da presença global de um grupo de estirpes de *M. bovis*, o complexo clonal Europa 1, que geralmente apresenta uma cópia de *IS6110*.

3.5.2 *Spoligotyping*

O *Spoligotyping* foi introduzido como um método rápido para determinar a epidemiologia molecular da tuberculose humana, e como uma alternativa para a identificação de amostras com poucas cópias de *IS6110* (KAMERBEEK et al., 1997). Desde a padronização do *Spoligotyping* para *M. bovis*, a técnica vem sendo considerada útil como um método rápido para caracterização de isolados e sua aplicabilidade em larga escala como primeira linha de tipagem (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004, SMITH et al., 2003)

Cada região DR corresponde à repetição regular de 2 tipos de pequenas sequências: que são todas idênticas, chamadas de sequências DR e sequências que são todas diferentes, chamadas de espaçadores. Entre as sequências DRs estão localizadas as sequências espaçadoras não repetitivas que podem conter de 34 a 41 pb (HERMANS et al., 1991). A associação de um espaçador e uma sequência contínua de DR é chamada de DVR. Comparando-se as regiões DR de vários isolados, observaram 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 isolados 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; MASSELOT; DURAND, 2004). 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 (ARANAZ et al., 1996).

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).

O poder de discriminação de isolados de *M. bovis* por *Spoligotyping* varia entre países e regiões geográficas. Estudos usando *Spoligotyping* em grandes populações da França (HADDAD et al., 2001), Portugal (DUARTE et al., 2008), Itália (BONIOTTI et al., 2009) revelaram discriminação satisfatória de isolados de *M. bovis*. Já estudos na Austrália (COUSINS et al., 1998), Irlanda do Norte (SKUCE et al., 2005) e Grã-Bretanha (HEWINSON et al., 2006) foram prejudicados devido ao baixo índice de discriminação.

Alguns estudos demonstraram que apenas o *Spoligotyping* não seria suficiente para todas as correlações epidemiológicas entre as estirpes 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 outras técnicas (ARANAZ et al., 1996; KAMERBEEK et al., 1997; COUSINS et al., 1998; ROCHA et al., 2012).

Spoligotyping tem se mostrado como uma boa ferramenta para identificar relações geneticamente distantes entre cepas de *M. bovis*, entretanto, nem sempre é possível concluir que os espoligotipos representam clones e que os isolados são epidemiologicamente relacionados (ZUMARRAGA et al., 1999; 2013).

2.5.3 VNTR-MIRU

O primeiro locus VNTR (variable number tandem repeat) identificado no genoma de *M. tuberculosis* consistiu de uma repetição em tandem 75 pb localizada no gene *katG* (GOYAL et al., 1994). Um estudo posterior de tipagem usando VNTR de isolados do MTBC, incluindo o locus previamente identificado, reconheceu mais cinco repetições que foram chamadas de repetições exatas em tandem (ETR) A a F e, estes variam de tamanho entre 53 e 79 pb (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998). Nos últimos anos, vários loci foram descritos, por exemplo, QUB11a, QUB11b, QUB18, QUB23, QUB26 (SKUCE et al., 2002). Outros loci foram encontrados dispersos no genoma de micobactérias, Supply et al. (1997) chamaram

estes loci de unidades micobacterianas repetitivas (MIRU) que variam em tamanho de 46-101 pb (RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012). Muitos loci VNTR adicionais foram identificados desde a primeira descrição de repetições em sequência (SMITTIPAT; PALITTAPONGARNPIM, 2000; SMITTIPAT et al., 2005) e logo ficou claro que a padronização da nomenclatura era necessária. Smittipat et al. (2005) sugeriram a utilização VNTR seguido por quatro dígitos correspondentes à posição do locus no *M. tuberculosis* H37Rv. No entanto, os nomes alternativos ainda são amplamente utilizados (ETR, MIRU, QUB). Muitos esforços têm sido feitos para padronizar o protocolo de tipificação e especialmente o uso de loci VNTR, a fim de permitir comparação inter-laboratorial dos resultados (ALLIX et al., 2006; SUPPLY et al., 2006). Estudos a fim de determinar um conjunto ideal de marcadores VNTR para *M. bovis* são menos abundantes que para *M. tuberculosis*, no entanto a tipagem VNTR-MIRU foi usada em muitos países para estudos epidemiológicos de *M. bovis* (RORING et al., 2002; SKUCE et al., 2002; RORING et al., 2004; HILTY et al., 2005; ALLIX et al., 2006; JEON et al., 2008; ROMERO et al., 2008; BONIOTTI et al., 2009; Mc LERNON et al., 2010; SAHRAOUI et al., 2010; MANDAL et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2012; PARREIRAS et al., 2012; ROCHA et al., 2012; SUN et al., 2012; RAMOS et al., 2014; CARVALHO et al., 2016).

A tipagem VNTR-MIRU visa loci genéticos que estão distribuídos por todo o genoma; esses loci contêm uma variação na quantidade de sequências repetidas (repetições em sequência). O polimorfismo nos loci do tipo repetição em sequência pode ocorrer tanto como uma mudança na sequência dos nucleotídeos, como da variação no número de unidades repetidas, consequentemente ambas criando uma variação alélica. A tipificação pelo VNTR é baseada no polimorfismo dos números destas sequências repetitivas organizadas em sequência no DNA (van BELKUM et al., 1998).

Para revelar o número de repetições em sequência, a PCR é realizada com oligonucleotídeos iniciadores destinados a amplificar individualmente os loci de repetição em sequência selecionados (COWAN et al., 2002). Primeiramente são realizadas PCR utilizando diferentes pares de iniciadores (um para cada VNTR-MIRU), para a determinação do número de repetições em cada locus. Após a amplificação de um dado locus, é determinado o tamanho (peso molecular em pares de base) do amplificado por eletroforese em gel de agarose, em comparação com marcadores de tamanho molecular para deduzir o número de repetição em

sequência presentes em cada locus. Para a interpretação dos resultados é utilizada uma tabela de alelos que relaciona o peso molecular obtido com o número de alelos repetidos em cada locus. O resultado final da tipagem VNTR-MIRU é um código numérico, que corresponde ao número de repetições do locus alvo e serve como uma impressão digital do respectivo isolado (BEER et al., 2012; RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012). Esse valor está relacionado com fórmula matemática que considera o valor do fragmento amplificado, com o tamanho molecular de cada repetição:

$$\text{Número de repetições} = \frac{\text{tamanho do produto amplificado} - \text{tamanho do fragmento sem cópia}}{\text{tamanho da unidade repetitiva}}$$

Uma vez determinado o perfil de alelos para cada estirpe, os dados são analisados empregando um aplicativo web MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>). Este serviço permite aos usuários acesso livre para analisar os dados de genotipagem das suas linhagens com um banco de dados de estirpes de referência que representa as principais linhagens do complexo *M. tuberculosis* (ALLIX-BEGUEC et al., 2008; WENIGER et al., 2010).

Estudos populacionais mostraram que a tipagem VNTR-MIRU tem sido mais eficiente do que a ferramenta padrão-ouro de tipagem, RFLP-*IS6110*, no estudo da transmissão da tuberculose, em ambientes com características epidemiológicas representativas de muitos países desenvolvidos (COLLINS, 2011). A técnica VNTR-MIRU permite a identificação de estirpes em circulação local ou internacional, o que é essencial para bons serviços de vigilância epidemiológica e controle de doenças (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004).

Pode ser utilizado com sucesso para distinguir estirpes de *M. bovis*, e quando loci adequados são selecionados, esta abordagem pode ter um poder de discriminação comparável ao de outros métodos de genotipagem (ALLIX et al., 2006) e tornaram-se a abordagem preferida para a tipificação de *M. bovis* (Mc LERNON et al., 2010). O uso de tipagem VNTR como parte integrante dos programas de controle tuberculose bovina gera uma grande quantidade de dados que podem ser explorados para descobrir a evolução e predomínio de estirpes em nível mundial (DUARTE et al., 2007; BONIOTTI et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram utilizados 110 isolados de *M. bovis* provenientes de quatro estados brasileiros: Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco e Santa Catarina. Todos os isolados foram obtidos após exame bacteriológico realizado em amostras de tecidos de bovinos, positivos ao teste de tuberculinização ou que apresentavam lesões sugestivas durante inspeção sanitária em abatedouro-frigorífico. O exame bacteriológico foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 EXAME BACTERIOLÓGICO

Para o exame bacteriológico as amostras de tecidos foram maceradas e descontaminadas pelo método de HPC (Cloreto de hexadecilpiridínio) (AMBROSIO et al., 2008). Após a descontaminação todas as amostras foram inoculadas em duplicatas em meios de Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen, incubadas a 37°C e observadas quanto ao crescimento micobacteriano semanalmente até completar 90 dias. Colônias sugestivas de micobactérias foram divididas em duas partes sendo uma parte da colônia utilizada na pesquisa microscópica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por meio da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e a outra parte transferida para microtubo com 200 µL de TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) para extração de DNA.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Todas amostras identificadas como BAAR foram submetidas a extração de DNA por meio do método de Boom et al. (1990). Para identificação de micobactérias e diferenciação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare* foram realizadas PCR seguindo o protocolo TB Multiplex PCR

(WILTON; COUSINS, 1992), onde são utilizados sequências do gene 16S rRNA específico do gênero *Mycobacterium* sp., as sequências com a região hipervariante de 16S rRNA que são específicas de *M. intracellulare* e o complexo *M. avium* e o gene MPB70 específico do complexo *M. tuberculosis*. Após amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Amostras com amplificação de 1030 pares bases (pb) foram identificadas como pertencendo ao gênero *Mycobacterium* spp. e amostras com fragmentos de 372 pb foram consideradas membros do complexo *M. tuberculosis*.

Todas as amostras de identificadas como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* foram amplificadas com os iniciadores da Região de Diferença 4 (RD4) para identificação de *M. bovis* (WARREN et al., 2006). Amostras com produtos amplificados de 268 pb foram identificadas como *M. bovis* e de 172 pb como outras micobactérias do complexo.

4.4 GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA DE VNTR-MIRU

As amostras identificadas como *M. bovis* foram genotipadas por meio de PCR com 26 iniciadores específicos (SUPPLY et al., 2006), sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação, localização e sequência dos 26 marcadores utilizados na genotipagem, por meio da técnica de VNTR-MIRU, de isolados de diferentes regiões do Brasil

Identificação	Lócus	Sequência (5'-3')
MIRU 2	154	TGGACTTGACGAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MIRU 4	580	GCGCAGAGCCCCGAAGTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU 10	960	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	1644	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	2059	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	2531	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
MIRU 24	2687	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	2996	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG

MIRU 27	3007	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	3192	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	4348	CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	802	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
VNTR-42	424	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
VNTR-43	577	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
VNTR-52	3690	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
VNTR-53	4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
VNTR-46	2347	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
VNTR-47	2401	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
VNTR-48	2461	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
VNTR-49	3171	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC
VNTR-1955	1955	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
ETR A	2165	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
QUB-11b	2163b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT
QUB-26	4052	AACGCTCAGCTGTCCGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
QUB-11a	2163a	CGTGATGTTGATCGGGATGT ACCCTGGAGTCTGGCATC
VNTR 3232	3232	CCCCAGCCTTACGACTGA GTCGGGCTTGGTGAAGG

Fonte: SOUZA-FILHO (2019).

Para o mix de PCR dos 24 primeiros iniciadores foram utilizados 6,4 µl de Go Taq Green Master Mix 1x (Promega®), 0,3 pmol de cada iniciador, 100 ng de DNA da amostra e água livre de nucleases suficiente para o volume final de 18 µl.

Para os dois últimos marcadores o protocolo está sumarizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes, concentrações e volumes utilizando na preparação de mix de PCR para genotipagem pela técnica de VNTR-MIRU com os marcadores 3232 e QUB-11a

Reagente	Concentração inicial	Volume (µL)
Tampão (1,5 mM – Quiagen)	10 x	2,5
Tampão Q (Quiagen)	5x	5
Mix de dNTPs	25mM/dNTP	0,4
Primer senso	100 µM	1
Primer anti-senso	100 µM	1
MgCl ²	25 mM	0,5
Taq Hot Star Polimerase (Quiagen)	5 U/µl	0,1
Água ultrapura	-	11,5
DNA	-	3
Volume total	-	25

Fonte: SOUZA-FILHO (2019).

Amostras de *M. tuberculosis* estirpe H37Rv, *M. bovis* AN5 e água livre de nucleases foram utilizadas como controles positivos e controle da reação, respectivamente.

As condições da PCR e eletroforese foram realizadas conforme Supply (2005). Os produtos de amplificação, de tamanho variável, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em migração paralela a padrões de massa molecular de 100 pb. Após a fotodocumentação as bandas foram analisadas para a estimar o tamanho dos fragmentos.

Para determinar a quantidade de cópias de alelos foi consultada a tabela publicada por Supply (2005) que relaciona o tamanho do fragmento obtido com a quantidade de alelos. O teste foi validado se o resultado do controle positivo era correspondente ao obtido por Supply (2005). O código numérico resultante foi utilizado na construção de uma tabela com perfil genético de cada isolado, a qual foi empregada na geração de dendrograma, formato UPGMA e de *Minimum Spanning Tree* (MST) por meio do programa BioNumerics 6.6 (*Applied Maths*).

4.5 GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA DE SPOLIGOTYPING - LUMINEX

4.5.1 AMPLIFICAÇÃO

Além da genotipagem por meio de VNTR-MIRU as amostras foram genotipadas por meio da técnica de *Spoligotyping* utilizando sistema Luminex. A técnica foi executada na *Unite Zoonoses Bacteriennes* do *Laboratoire de Santé Animale* da *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de*

l'Environnement et du Travail, em Maison-Alfort, França. Para todas as análises foi utilizado como controle positivo a estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*. Os reagentes, concentrações e volumes utilizados na PCR estão sumarizados na Tabela 4 e o ciclo utilizado no termociclador na Tabela 5.

Tabela 4 – Reagentes, concentrações e volumes utilizando na preparação de mix de PCR para genotipagem pela técnica de *Spoligotyping* - Luminex

Reagente	Concentração inicial	Volume (µL)
Buffer (1,5 mM)	10 x	10
BSA	15 µM	5
Mix de dNTPs	25mM/dNTP	0,4
Primer Dra*	100 µM	0,2
Primer Drb**	100 µM	0,2
MgCl ²	25 mM	0,5
Taq Polimerase	5 U/µl	0,2
Água ultrapura	-	23,5
DNA	-	5
Volume total	-	50

Fonte : SOUZA-FILHO (2019).

*Sequência do primer Dra: (5'biotin-GTT TTT GGG TCT GAC GAC 3')

**Sequência do primer Drb: 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3')

Tabela 5 – Temperaturas e tempos empregados na amplificação utilizada na técnica de *Spoligotyping* - Luminex

Temperatura	Tempo	} 40 repetições
95 °C	10 min	
95 °C	40 s	
55 °C	40 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	
12 °C	∞	

Fonte : SOUZA-FILHO (2019).

4.5.2 Hibridização em microesferas

Para a hibridização dos produtos de PCR foi utilizado o kit comercial TB-SPOL (Beamedex® – França). O kit é composto por um mix de 43 tipos de microesferas magnéticas, sendo que em cada tipo de microesfera está acoplada uma das 43 sequências dos espaçadores da região CRISPR. Além das microesferas o kit contém estreptavidina-peroxidase, que tem o objetivo de se ligar a biotina presente no primer Dra, formando o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, que é analisado e quantificado por sistemas luminex.

Inicialmente as microesferas foram homogeneizadas em sonificador por 30 segundos. Após homogeneização foram diluídas em solução TMAC (cloreto de

amônio de tetraetil) para concentração final de 60 microesferas / μl microlitro de solução. Depois preparou-se mix com 20 μl da solução de microesferas, 15 μl /de tampão TE e 5 μl de produtos de PCR. Esse mix foi preparado em placa e incubado em termociclador a 95 °C por 10 minutos e depois a 52 °C por 20 minutos para permitir que os produtos amplificados se ligassem nas sequências acopladas as microesferas. Após incubação, a placa foi retirada do termociclador e colocada sob base magnética por 1 minuto, fazendo com que as microesferas se concentrassem ao fundo da placa, após esse tempo o sobrenadante foi descartado, virando a placa ainda acoplada na base magnética. Em seguida a placa foi retirada da base magnética e as microesferas ressuspensas em 50 μl de água livre de nucleasse. Junto as microesferas ressuspensas foi adicionado 25 μl de solução estreptavidina-peroxidase diluída à 0.005 μg / μL em TMAC. A placa foi homogeneizada por 1 minuto em vortex e levada para leitura no equipamento Bio-Plex 2000 (Bio-Rad). No equipamento, o produto de cada poço da placa foi aspirado e conduzido por capilar, durante o trajeto nesse capilar uma área emitia dois raios, sendo um vermelho e outro verde. O raio vermelho identificava cada uma das 43 microesferas, já o raio verde analisava e quantificada a emissão de fluorescência do complexo estreptavidina – biotina – peroxidase. Após quantificação o equipamento emitia o resultado em formato digital.

4.5.3 Análise dos resultados

A interpretação dos resultados baseou-se na determinação de ponto de corte que indicou a presença ou ausência de cada um dos espaçadores. Os dados brutos foram analisados por meio de uma matriz que agrupou os valores de fluorescência de acordo com o seu valor.

Para determinar o ponto de corte de cada espaçador foi avaliado o valor mais baixo de amostras com alta fluorescência e o valor mais alto de amostras de baixa fluorescência. Cada série de análises deve ser analisada de forma independente para cada espaçador.

Após análise dos 43 espaçadores, o perfil de espoligotipo era analisado e comparado com o bando de dados disponível em rede por meio do site www.mbovis.org. Os perfis obtidos foram utilizados na geração de dendrogramas,

formato UPGMA e de *Minimum Spanning Tree* (MST) por meio do programa BioNumerics 6.6 (*Applied Maths*).

4.5 CÁLCULO DE PODER DE DISCRIMINAÇÃO E DIVERSIDADE ALÉLICA

Para analisar a diversidade alélica dos loci de VNTR-MIRU e com isso selecionar os marcadores com maior polimorfismo, 179 isolados previamente caracterizados pela técnica *Spoligotyping* (Rocha, 2012), foram utilizados para genotipagem pela técnica de VNTR-MIRU com os 24 marcadores proposto por Supply et al (2006).

O cálculo da diversidade alélica de cada locus (h) foi realizado conforme a fórmula publicada por Selander et al. (1986):

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

sendo x_i a frequência do alelo i no locus e n o número de isolados.

O poder de discriminação da técnica MIRU-VNTR com 24 loci foi feito conforme fórmula de Hunter – Gaston (1988):

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

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

5 RESULTADOS

Foram analisados 110 isolados dos 4 estados brasileiros, a distribuição de isolados por estados, municípios, propriedades e o quantidade genótipos identificados em cada técnica estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição da quantidade de isolados de *M. bovis*, cidades, propriedades e perfis obtidos pelas técnicas de *Spoligotyping* e VNTR-MIRU em quatro estados brasileiros

ESTADO	Nº DE ISOLADOS	CIDADES	PROPRIEDADES	ESPOLIGOTIPOS	GENÓTIPOS VNTR-MIRU
Mato Grosso	47	27	35	10	31
Paraíba	14	3	6	5	10
Pernambuco	17	1	1	5	08
Santa Catarina	32	9	16	7	13
TOTAL	110	40	58	23	62

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Dos 23 espiligotipos identificados nos isolados analisados, três são descritos pela primeira vez no presente trabalho. O perfil de cada novo espiligotipo está relacionado na Tabela 7.

Tabela 7 – Três novos espiligotipo identificados no presente estudo

ESPOLIGOTIPO	PERFIL	Nº ISOLADOS	ESTADO DE ORIGEM
SB NOVO 1	11011111011111101111101111110011111110100000	1	Mato Grosso
SB NOVO 2	110001110110111011111111111111111110100000	1	Pernambuco
SB NOVO 3	11011111010011101111101101111111111110100000	2	Pernambuco

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Para facilitar a visualização e interpretação dos dados os resultados de Mato Grosso e Santa Catarina são apresentados de forma separada e dos estados de Paraíba e Pernambuco, devido baixo número de amostras, são apresentados conjuntamente.

5.1 MATO GROSSO

No estado de Mato Grosso foram analisados 47 isolados de *M. bovis*. Por meio da técnica de *Spoligotyping* foram identificados 10 espiligotipos. Os perfis dos espiligotipos, a frequência e a distribuição por município e propriedade estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Dendrograma com os 10 perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de amostras *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Mato Grosso, ano de isolamento, cidade de origem e propriedade e espiligotipos.

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

A Figura 2 apresenta os perfis distribuídos por meio de MST, sendo que as cores representam as variáveis analisadas: município e propriedade de origem.

Figura 2 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de amostras de *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Mato Grosso. As cores representam os espilogotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Por meio da Figura 1 e Figura 2 foi possível visualizar a formação de agrupamentos (mais de um isolado com mesmo perfil) nos espilogotipos SB0121 (12 isolados), SB0295 (14 isolados), SB0881 (4 isolados), SB1050 (2 isolados), SB1136 (5 isolados) e SB1145 (6 isolados), sendo que em todos esses espilogotipos os isolados estavam distribuídos em vários municípios. Os espilogotipos SB1141, SB1049, SB0822 e um perfil novo foram identificados uma única vez.

Alguns municípios continham mais de um isolado de uma mesma propriedade e todos com o mesmo espilogotipo, tais como como Arenápolis (SB0295), Colíder (SB0121), Jaciara (SB0121) e Nova Marilândia (SB0295). Já em Barra do Garças, Nova Xavantina e Rondonópolis os isolados obtidos eram de propriedades e espilogotipos diferentes, incluindo o perfil novo identificado em Nova Xavantina. Em Campo Novo dos Parecis e Sorriso os isolados eram de mesma propriedade, mas apresentaram espilogotipos diferentes, enquanto que em Juína e Novo São Joaquim os isolados de mesmo espilogotipos eram originados de

propriedades diferentes. No município de Juscimeira foram obtidos três isolados, todos de propriedades diferentes, no entanto duas delas (P03 e P25) possuíam isolados de mesmo perfil (SB0121).

Por meio da técnica de VNTR-MIRU os 47 isolados de *M. bovis* apresentaram 31 perfis diferentes, que são apresentados por meio do dendograma (Figura 3) e MST (Figura 4).

Figura 3 - Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Mato Grosso, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos

Fonte: SOUZA FILHO (2019)

Figura 4 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras de *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Mato Grosso. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Dos 31 perfis identificados, sete são agrupamentos, sendo dois agrupamentos com seis isolados, um agrupamento com três isolados e quatro agrupamentos com dois isolados. Os outros 24 perfis são órfãos, sendo identificado em único isolado.

Analisando a similaridade dos perfis de VNTR-MIRU com *Spoligotyping*, foi possível observar que o espoligotipo SB1145 apresentou o mesmo perfil de VNTR-MIRU em seis isolados, em anos, municípios e propriedades diferentes. Os isolados 001 e 024 apresentaram perfil VNTR-MIRU e espoligotipo (SB0121) idênticos, no entanto são de municípios diferentes (Cotriguaçu e Jaciara) e foram isolados em anos distintos.

Já os espoligotipos SB0881 e SB1136 apresentaram isolados, de municípios diferentes, com perfis de VNTR-MIRU similares, com diferença em poucos *loci*. Os

espoligotipos mais frequentes, SB0121 e SB0295, apresentaram vários perfis de VNTR e foram observados distribuídos em vários municípios e propriedades.

Os isolados 003 e 035 possuem mesmo perfil VNTR-MIRU, mas espoligotipos e municípios diferentes. Em Arenápolis foram obtidos três isolados de mesma propriedade, espoligotipo e ano, no entanto um isolado apresentou deleções em três *loci* em relação aos outros dois isolados.

5.2 SANTA CATARINA

Em Santa Catarina foram analisados 32 isolados, provenientes de 16 propriedades distribuídas em 9 municípios. Por meio da técnica de *Spoligotyping* foram identificados sete perfis: SB0121, SB0130, SB0295, SB0329, SB0559, SB0881, SB1140. O perfil e a distribuição de cada espoligotipo pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 – Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de amostras *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Santa Catarina, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Figura 6 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de amostras de *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Santa Catarina. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)

Fonte: SOUZA-FILHO (2019).

O espoligotipo SB0295 foi identificado em 14 isolados, SB0121 em 10 isolados e SB0559 em quatro isolados. Os demais espoligotipos foram identificados em um isolado.

O espoligotipo SB0295 foi identificado em seis municípios e sete propriedades, sendo que no município de Descanso, apenas esse espoligotipo foi observado, mesmo em isolados de propriedades diferentes. O espoligotipo identificado como SB0121 estava distribuído em seis propriedades de cinco municípios. Já o perfil SB0559 foi observado em quatro isolados em uma propriedade do município de Lacerdópolis. Do município de Guaraciaba foram sete isolados de duas propriedades, sendo que na propriedade P40 apenas espoligotipo SB0121 foi identificado. Já na propriedade P39 dois isolados (052 e 054) apresentaram espoligotipo igual ao observado na propriedade P40 e os isolados 051 e 053 com perfil SB0295.

Por meio da técnica de VNTR-MIRU os 32 isolados de *M. bovis* apresentaram 13 perfis diferentes, que são apresentados por meio do dendograma (Figura 7) e MST (Figura 8).

Figura 7 - Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Santa Catarina, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Figura 8 – MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de amostras de *M. bovis* isolados de bovinos no estado de Santa Catarina. As cores representam os espoligotipos (a), as cidades (b) e as propriedades (c)

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Dos 13 perfis de VNTR-MIRU, quatro apresentam a formação de agrupamentos, sendo o maior com sete isolados, um agrupamento com seis isolados e outros dois com cinco isolados cada. Nove isolados são perfis únicos.

Isolados identificados como SB0295 foram os que apresentaram maior diversidade genética quando analisados por meio de VNTR-MIRU. Assim como já observado por meio de *Spoligotyping*, as amostras provenientes de Descanso também apresentaram o mesmo perfil de VNTR-MIRU, mesmo de propriedades diferentes, além dos isolados desse município, outro isolado de município distinto também foi agrupado devido a identidade genética entre eles. Os isolados de Lacerdópolis apresentaram mesmo espoligotipo, mas um isolado apresentou perfil distinto dos demais devido alteração na quantidade de alelos no locus 3232. Os isolados com perfil VNTR agrupados, apresentaram diversidade de espoligotipo e

propriedades relacionados, ou seja, amostras de origens diferentes, com espoligotipos diferentes, mas mesmo perfil VNTR-MIRU.

5.3 PARAÍBA E PERNAMBUCO

Dos dois Estados foram obtidos 32 isolados, sendo que de Paraíba foram 14 isolados, provenientes de três municípios e seis propriedades. De Pernambuco foram 17 isolados todos provenientes do município de Garanhuns, no entanto dados sobre propriedades não estavam disponíveis. Por meio da técnica de *Spoligotyping* foi possível identificar nove espoligotipos, desses dois perfis novos. A distribuição dos espoligotipos está ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Dendograma com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de amostras *M. bovis* isolados de bovinos nos estados de Paraíba e Pernambuco, ano de isolamento, cidade de origem, propriedade e espoligotipos

Fonte: SOUZA FILHO (2019).

Dos nove espoligotipos identificados, somente dois espoligotipos apresentaram apenas um isolado, SB0298 e um espoligotipo novo. Os demais

espoligotipos apresentaram agrupamentos. O perfil SB1055 foi identificado em sete isolados de Garanhuns e SB0295 em cinco isolados do mesmo município. O espoligotipo SB0140 foi identificado em cinco isolados, sendo dois de municípios diferentes, os três restantes de mesmo município, mas propriedades distintas. Situação similar foi observado nos espoligotipos SB1144 e SB0267, todos originados de Patos, mas em propriedades diferentes. O perfil SB0120 foi o único perfil compartilhado pelos dois estados, sendo identificado em 2 isolados de cada estado. Patos foi a única cidade que era possível analisar diferença de isolados entre propriedades e como já descrito cada propriedade apresentava mais de um perfil de espoligotipo.

5.4 BRASIL

Foram analisados 289 isolados provenientes de 11 estados brasileiros. Por meio da técnica de *Spoligotyping* foram identificados 42 espoligotipos e pela técnica de VNTR-MIRU 173 perfis diferentes. A Tabela 7 sumariza a quantidade de isolados, de espoligotipos e perfis VNTR identificados em cada estado.

Tabela 8 – Distribuição dos 289 isolados de *M. bovis* de acordo com o estado, quantidade de isolados, espoligotipos e perfis de VNTR-MIRU identificados

ESTADO	ISOLADOS	ESPOLIGOTIPOS	VNTR-MIRU
Espírito Santo	01	01	01
Goiás	15	08	12
Minas Gerais	61	17	47
Mato Grosso do Sul	05	04	05
Mato Grosso	53	11	34
Paraíba	14	05	10
Pernambuco	17	05	08
Rio Grande do Sul	32	07	23
Santa Catarina	32	07	09
São Paulo	56	16	47
Tocantins	03	02	03

Fonte: SOUZA-FILHO (2019)

A Figura 10 mostra MST construído classificando os espoligotipos e a Figura 11 mostra a distribuição de cada espoligotipo por cada estado.

Figura 10 - MST com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de 289 isolados de *M. bovis* provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um espoligotipo identificado.

Fonte: SOUZA-FILHO (2019)

Figura 11 - MST com os perfis obtidos por meio da técnica *Spoligotyping* de 289 isolados de *M. bovis* provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um estado brasileiro

61	MG
56	SP
53	MT
32	SC
32	RS
17	PE
15	GO
14	PB
5	MS
3	TO
1	H37Rv
1	ES

Fonte: SOUZA-FILHO (2019)

Dos 42 espoligotipos identificados, 22 apresentaram a formação de agrupamentos, ou seja, mais de um isolado com mesmo espoligotipo. Todos os estados analisados apresentaram mais de um espoligotipo, no entanto alguns espoligotipos só foram identificados em estados específicos como o SB1136 no estado de Mato Grosso, SB1055 em Pernambuco, SB0559 em Santa Catarina, SB0125 em São Paulo e SB0333 em Minas Gerais.

As Figuras 12 e 13 mostram a distribuição dos perfis obtidos por meio de VNTR-MIRU em árvore MST de acordo com o espoligotipo e o estado, respectivamente. Dentre os perfis obtidos em 44 foi possível visualizar a formação de agrupamentos e em 19 os isolados eram provenientes de estados diferentes. Por meio de espoligotipos não foi possível visualizar nenhuma tendência de formação de agrupamentos ou similaridade, apesar que em 14 agrupamentos de VNTR-MIRU apenas um espoligotipo foi identificado. Já quando analisado de acordo com o estado de origem observou-se similaridade maior entre os isolados provenientes de Santa Catarina, Mato Grosso e Paraíba.

Figura 12 - MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de 289 isolados de *M. bovis* provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um esplogotipo identificado

Figura 13 - MST com os perfis obtidos por meio da técnica VNTR-MIRU de 289 isolados de *M. bovis* provenientes de 11 estados brasileiros. Cada cor representa um estado brasileiro

Fonte: SOUZA-FILHO (2019).

O poder de discriminação da técnica de *Spoligotyping* foi de 0,85, enquanto que a técnica de VNTR-MIRU apresentou poder de discriminação de 0,99. A Tabela 9 mostra a diversidade alélica dos 24 loci de VNTR-MIRU. Por meio dessa tabela é possível visualizar quais os marcadores com maior poder de discriminação entre os isolados de *M. bovis*.

Tabela 9 - Distribuição e diversidade alélica dos loci VNTR-MIRU dos 289 isolados de *M. bovis*, provenientes de 11 estados brasileiros

Alias	Lócus	Número de isolados de acordo com a quantidade de alelos										Diversidade alélica
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	NA	
MIRU 31	3192			2	107	88	4	84	3		1	0,6821
ETR-A	2165				1	6	25	134	106	11	6	0,6259
MIRU 16	1644		1	40	144	100	1				3	0,6033
ETR - B	2461			7	18	160	90	7	3		4	0,5783
QUB-26	4052				10	37	195	13	9	10	15	0,4687
ETR – C	577				51	9	130	1			98	0,4604
MIRU 40	802		7	194	83						5	0,4454
QUB 11b	2163b		15	228	16	14	13	1			2	0,3564
Mtub 21	1955		13	46	223	2					5	0,3528
MIRU 25	2996			3	14	35	230	6			1	0,3423
MIRU 39	4348		1	212	5	50	1				20	0,3415
MIRU 04	580			5	230	46		1			7	0,3054
MIRU 23	2531			10	1	243	32	1			2	0,2669
MIRU 27	3007		15	5	266						3	0,1289
Mtub 04	424	9	2	278							0	0,0704
Mtub 34	3171			3	7	277					2	0,0645
Mtub 39	3690			280	9						0	0,0571
Mtub 30	2401			2	5	281	1				0	0,0510
Mtub 29	2347			1	4	283	1				0	0,0375
MIRU 10	960		1	284	3						1	0,0241
MIRU 24	2687		4	285							0	0,0239
QUB 4156	4156	5	284								0	0,0227
MIRU 02	154			289							0	0,0000

Fonte: SOUZA-FILHO (2019).

Observou-se que quatro loci apresentaram alto polimorfismo (índice $h \geq 0,50$): MIRU 31, ETR-A, MIRU 16 e ETR – B. Os marcadores QUB-26, ETR – C,

MIRU 40, QUB 11b, Mtub 21, MIRU 25 e MIRU 39 apresentaram polimorfismo moderado (índice h entre 0.33 e 0.49). Os marcadores MIRU 04, MIRU 23, MIRU 27, Mtub 04, Mtub 34, Mtub39, mtub 30, Mtub29, MIRU 10, MIRU 24 e QUB 4156 apresentaram baixa diversidade alélica e no MIRU 2 não houve polimorfismo.

6 DISCUSSÃO

No Brasil, pela primeira vez se estudou a diversidade genética de isolados de *M. bovis*, provenientes de diferentes regiões do país, utilizando as técnicas de *Spoligotyping* e VNTR-MIRU com 24 iniciadores. As 289 amostras genotipadas evidenciaram por meio das técnicas alta diversidade genética, sendo que somente pela técnica de MIRU-VNTR, identificou-se 173 perfis. Essa alta diversidade pode ser consequência da falta de controle de animais infectados, que são criados livres em pastos, o uso compartilhado de pastagens e água, assim como a promiscuidade entre rebanhos com diferentes status sanitários que podem contribuir à manutenção da infecção no território (AMATO et al., 2018). O Estado de Mato Grosso apresentou a maior diversidade genética dos isolados de *M. bovis*, pois apresentou a maior quantidade de perfis isolados tanto na técnica de *Spoligotyping*, como no VNTR-MIRO, provavelmente devido a maior movimentação animal, eventos de compra e venda de animais e introdução de animais de outras origens que o próprio Estado.

O espoligotipo SB0121 foi o perfil mais difundido nos estados analisados. Esse espoligotipo já foi relatado em outros estudos de diferentes regiões do Brasil, como no Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 2014), São Paulo (ROCHA et al., 2013) e Minas Gerais (PARREIRAS et al., 2012), no estado da Bahia (ALZAMORA FILHO et al., 2014), Mato Grosso do Sul (CAZOLA et al., 2015) e Mato Grosso (CARVALHO et al., 2016), Assim como a estipe SP38 recentemente sequenciada (ZIMPEL et al., 2017). Fora do Brasil, SB0121 é o espoligotipo mais predominante e já foi descrito na Holanda, França, Itália, Bélgica, Portugal, Espanha, Argélia, África do Sul, México (GHAVIDEL et al., 2018).

O segundo espoligotipo mais frequente foi o SB0295, encontrado em todos estados analisado exceto Paraíba. Outros estudos também identificaram este espoligotipo nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia (PARREIRAS et al., 2012; ROCHA et al., 2013;

ALZAMORA FILHO et al., 2014; CAZOLA et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). O espoligotipo SB0295 também foi descrito em Espanha, Portugal, França e México e Argentina (ZUMÁRRAGA et al., 2013; GHAVIDEL et al., 2018).

O terceiro espoligotipo mais frequente foi o SB1380 observado nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás. Esse espoligotipo foi identificado na Espanha (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012) mas não foi relatado em outros estudos, nem no Brasil, nem no mundo.

O espoligotipo SB0140 foi observado em 17 isolados de diferentes estados. Estudos anteriores no Brasil também relataram esse espoligotipo (ROCHA et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). Esse perfil já foi detectado na Ásia, Europa e na Américas, sendo um dos espoligotipos mais disperso pelo mundo (ANDRIEVSKAIA et al., 2018; GHAVIDEL et al., 2018).

O SB1050 foi encontrado em diversos estados, mas o SB1055 encontrado apenas no estado de Pernambuco. Esses dois perfis já foram relatados em países como Argentina, Paraguai, Uruguai, México, Costa Rica e Brasil (PARREIRAS et al., 2012; ZUMÁRRAGA et al., 2013; ALZAMORA FILHO et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). O espoligotipo SB0881 já foi descrito como terceiro mais comum no Brasil (ZUMÁRRAGA et al., 2013) e foi identificado em diversos estados nesse estudo, mas apenas no estado de Mato Grosso do Sul no estudo de Carvalho et al. (2016).

Em relação as análises de *M. bovis* nos Estados da Paraíba e Pernambuco podemos observar que a diversidade genética dentro das propriedades é maior que o observado nos outros Estados, além disso que há uma maior tendência de observar genótipos irmãos da SB0120 na região Nordeste. O perfil identificado com ancestral SB0120 foi observado com maior frequência em estados do Nordeste, como os perfis SB1055, SB0267 e SB0268. Esses perfis possuem em comum a presença do espaçador 21, característica que sugere complexo clonal europeu 1 (SMITH, 2012). Provavelmente isso deve ser influência da colonização holandesa nessa região do Brasil.

Os isolados de *M. bovis* procedentes de Santa Catarina demonstra a menor variedade genética entre os estados analisados, provavelmente devido a menor movimentação animal, consequência do estado livre de febre aftosa. Outra possibilidade é a maior pressão no controle, identificação e eliminação dos animais positivos, devido ao Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose realizado pelas Secretárias de Defesa Agropecuárias e pelo MAPA.

Vários estudos relataram diferentes valores para o poder de diferenciação para a técnica de *Spoligotyping* e VNTR-MIRU. Os valores observados para o *Spoligotyping* variaram de 0,14 a 0,98 e para o MIRU-VNTR de 0,66 a 0,93 (GHAVIDEL et al., 2018). O poder de discriminação da técnica de *Spoligotyping* foi de 0,85 inferior ao 0,99 observado na técnica de VNTR-MIRU. Alguns estudos mostraram que o MIRU-VNTR possui maior poder devido alta taxa de mutagenicidade de acordo com a região geográfica de origem da amostra (Lamine-Khemiri et al., 2014; Gormley et al., 2014; NAVA VARGAS et al., 2016). O alto valor observado para VNTR-MIRU é consequência da alta diversidade genética observada que pode ter sido influenciada devido o estudo analisar isolados de diferentes estados de país continental como o Brasil além do uso de maior número de marcadores.

Tanto pela técnica de *Spoligotyping*, quanto VNTR-MIRU, foi possível visualizar a formação de agrupamentos. Padrões de formação em grupos são indicativos de infecção exógena, resultante de transmissão recente e de natureza clonal, típicas em surtos epidemiológicos. A transmissão recente não acarreta variabilidade genética suficiente a ponto dos isolados serem diferenciados em grupos distintos (ADESOKAN et al., 2019). Os isolados de perfil único, não estabelecem vínculo epidemiológico com as demais estirpes, sugerem infecção proveniente de reativação de uma infecção latente, indicando que a infecção primária tenha ocorrido em diferentes contextos geográficos e temporais (García de Viedma et al., 2011).

O elevado número de perfis VNTR observado em alguns espoligotipos, como SB0121 e SB0295, sugere uma aparência ancestral destes espoligotipos mais frequentes e sua evolução em muitas variantes diferentes (AMATO et al., 2018).

A escolha do conjunto dos loci mais apropriados para genotipagem não é consensual nem está uniformizada para todos os laboratórios. Os loci VNTR-MIRU podem exibir poder discriminatório diferente em diferentes linhagens de micobactérias. Para maximizar o poder discriminatório e minimizar os custos com genotipagem, apenas os marcadores VNTR-MIRU que oferecem maior poder discriminatório dentro de uma linhagem em particular devem ser usados (Comas et al., 2009). No Brasil não foi relatado estudo que avaliou os 24 marcadores padronizados por Supply et al (2006) em diferentes regiões do Brasil. Apenas dois estudos utilizaram esses marcadores em tipagem de *M. bovis*, sendo um com

amostras provenientes do centro oeste (CARVALHO et al., 2016). Foi observado que os marcadores mais polimórficos são: ETR-A, QUB11b, seguido por MIRU 16, MIRU 27, ETR-B, ETR-C, Mtub21, QUB 26, nos outros 16 marcadores foi observado baixo ou nenhum polimorfismo. Já no Rio Grande do Sul um estudo observou que os marcadores MIRU 31 e ETR-A, ETR-B e ETR-C foram os marcadores capazes de diferenciar isolados de um foco de tuberculose bovina (SOUZA-FILHO et al., 2016), indo de acordo com os resultados obtidos no presente estudo com um maior número de amostras testadas.

No presente estudo observou-se que quatro loci apresentaram alto polimorfismo (índice $h \geq 0,50$): MIRU 31, ETR-A, MIRU 16 e ETR – B. Os marcadores QUB-26, ETR – C, MIRU 40, QUB 11b, Mtub 21, MIRU 25 e MIRU 39 apresentaram polimorfismo moderado (índice h entre 0.33 e 0.49). Os demais apresentaram baixo polimorfismo e no caso do MIRU 2 não houve polimorfismo. Os marcadores polimórficos são similares ao observado por Carvalho et al. (2016) com isolados no Brasil e por (NAVA VARGAS et al., 2016), que analisando isolados do México observaram que os marcadores mais discriminatório eram ETR-B, ETR-A e QUB-26. Visando a redução de custos e agilidade nas análises e baseado no poder discriminatório dos marcadores, os 11 selecionados para melhor discriminação dos isolados de *M. bovis* no Brasil são: MIRU 31, ETR-A, MIRU 16 e ETR – B, QUB-26, ETR – C, MIRU 40, QUB 11b, Mtub 21, MIRU 25 e MIRU 39.

7 CONCLUSÕES

A partir das análises dos resultados podemos concluir que há no Brasil uma grande diversidade genética de *M. bovis*, independente da região geográfica, visto a grande quantidade de perfis observados pelas técnicas de *Spoligotyping* e VNTR-MIRU e também por continuarmos encontrando novos tipos identificados apenas no Brasil.

O Estado de Mato Grosso apresentou a maior diversidade genética dos isolados de *M. bovis*, pois apresentou a maior quantidade de perfis isolados tanto na técnica de *Spoligotyping*, como no VNTR-MIRO.

Em relação as análises de *M. bovis* nos Estados da Paraíba e Pernambuco podemos concluir que a diversidade genética dentro das propriedades é maior que o observado nos outros Estados, além disso que há uma maior tendência de observar genótipos irmãos da SB0120 na região Nordeste.

Os isolados de *M. bovis* procedentes de Santa Catarina demonstra a menor variedade genética entre os estados analisados, provavelmente devido a menor movimentação animal, consequência do estado livre de febre aftosa.

Pela análise do VNTR-MIRU 24 primers, concluímos que os loci mais polimórficos são: ETR-A, QUB11b, MIRU 16, MIRU 27, ETR-B, ETR-C, Mtub21, QUB 26.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais**. 1998. 328 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1998.
- ADESOKAN, H. K. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from livestock workers and cattle in Nigeria. 2019.
- ALEXANDER, K. A. et al. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. Mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296–1299, 2010.
- ALZAMORA FILHO, F. et al. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 103–108, 2014.
- ALLIX, C. et al. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with *IS6110* restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, Jun 2006.
- ALLIX-BEGUEC, C. et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, Aug 2008.
- AMATO, B. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from livestock and wild animals in Italy suggests the need for a different eradication strategy for bovine tuberculosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. e416–e424, 2018.
- ANDRIEVSKAIA, O. et al. Genotypes of *Mycobacterium bovis* strains isolated from domestic animals and wildlife in Canada in 1985–2015. **Veterinary Microbiology**, v. 214, n. December 2017, p. 44–50, 2018.
- ARANAZ, A. et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: A tool for studying epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2734-2740, Nov 1996

BAHIENSE, L. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3549–3560, 2016.

BARBIERI, J. D. M. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3531–3548, 2016.

BEER, J. L. et al. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 662-9, Mar 2012.

BERG, S. et al. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 3, p. 670–678, 2011.

BIET, F. et al. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 411-436, May-Jun 2005.

BONIOTTI, M. B. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 636-44, Mar 2009.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.495-503, 1990.

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

BRITES, D. et al. A new phylogenetic framework for the animal-adapted mycobacterium tuberculosis complex. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

CARVALHO, R. C. T. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* from cattle reared in midwest Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–16, 2016.

CAZOLA, D. de O. et al. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul **Pesqui. vet. bras**, v. 35, n. 2, p. 141–147, 2015.

COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 1–2, p. 2–7, 2011.

COMAS, I. et al. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 2009.

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

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1–2, p. 162–171, 2012.

COUSINS, D. et al. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, n. 6, p. 471-478, JUN 1998.

DE ARAÚJO, C. P. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 749–752, 2005.

DEAN, G. S. et al. Minimum effective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6467–6471, 2005.

DEVALLOIS, A. et al. Molecular typing of mycobacteria. **Pathologie Biologie**, v. 46, n. 8, p. 625-636, Oct 1998.

DIAS, R. A. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3673–3684, 2016.

DUARTE, E. L. et al. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, Aug 25 2008.

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

DURR, P. A.; CLIFTON-HADLEY, R. S.; HEWINSON, R. G. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis - II. Applications of genotyping. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 19, n. 3, p. 689–701, 2000.

FERREIRA NETO, J. S. et al. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis , Brazil Avaliação de 15 anos do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose , Brasil. p. 3385–3402, 2016.

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, May 1998.

GALVIS, J. O. A. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3567–3578, 2016.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7877–82, 2003.

HERMANS, P. et al. Insertion element IS987 From *Mycobacterium-Bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 8, p. 2695-2705, AUG 1991

GHAVIDEL, M. et al. The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, n. February, p. 310–315, 2018.

GORDON, S. V et al. Genomics of *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 81, n. 1/2, p. 157–163, 2001.

GOYAL, M. et al. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, Dec 1994.

GUEDES, I. B. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3579–3588, 2016.

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary Science**, v. 76, n. 1, p. 1–18, 2004.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson ' s Index of Diversity. v. 26, n. 11, p. 2465–2466, 1988.

HEWINSON, R. G. et al. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, Feb 25 2006.

HILTY, M. et al. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 217-222, Aug 2005.

JEON, B.-Y. et al. Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, Jun 2008.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907–914, 1997.

KEATING, L. A. et al. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. v. 56, p. 163–174, 2005.

LIMA, P. R. B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3601–3610, 2016.

MANDAL, S. et al. Investigating Transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1943-1950, May 2011.

MCLERNON, J. et al. Evaluation of Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Spoligotyping for Genotyping of *Mycobacterium bovis* Isolates and a Comparison with Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, Dec 2010.

MEDEIROS, L. S. et al. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd TT - Avaliação da histopatologia na descrição dos diferentes estágios da tuberculose bovina em rebanhos naturalmente infectados. **Pesqui. vet. bras**, v. 32, n. 2, p. 135–139, 2012.

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

MODA, G. et al. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 77, n. 2, Apr 1996.

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

NAVA VARGAS, A. et al. Genetic diversity based on MIRU-VNTR profile of isolates of *Mycobacterium bovis* from Mexican cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 131, p. 75–78, 2016.

NEILL, S. D. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, May 1994.

NÉSPOLI, J. M. B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, 2016.

OMS; OIE, FAO. Roadmap for zoonotic tuberculosis. **Roadmap for zoonotic tuberculosis**, p. 21, 2017.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man - a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, Aug 1995.

PARREIRAS, P. M. et al. *Spoligotyping* and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 64–73, 2012.

PEIX, A.; RAMIREZ-BAHENA, M.-H.; VELAZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, Dec 2009.

PHILLIPS, C. J. C. et al. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 1, Feb 2003.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Vet J**, v. 163, n. 2, p. 115-27, Mar 2002.

QUEIROZ, M. R. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3647–3658, 2016.

RAMOS, D. F. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 657–660, 2014.

REVIRIEGO GORDEJO, F. J.; VERMEERSCH, J. P. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, p. 101-9, 2006.

RIBEIRO, L. A. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3561–3566, 2016.

ROMERO, B. et al. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 1-2, Nov 25 2008.

ROCHA, V. C. F. et al. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 17–21, 2013.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S. et al. European 2 - A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 866–872, 2012.

RORING, S. et al. 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, Jun 2002.

RORING, S. et al. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 65-73, Jun 10 2004.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 18, n. 1, p. 101-108, 1997.

SAHRAOUI, N. et al. Evaluation of variable number of tandem repeats (VNTR) isolates of *Mycobacterium bovis* in Algeria. **Annales De Biologie Clinique**, v. 68, n. 4, Jul-Aug 2010.

SALES, É. B. **Genotipagem de *Mycobacterium bovis* pelo Multispace Sequence Typing**. 2012, 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

SELANDER, R.K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.873-884, 1986

SILVA, M. D. C. P. et al. Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the State of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3611–3624, 2016.

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

SKUCE, R. A. et al. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRS). **Veterinary Record**, v. 157, n. 17, Oct 22 2005.

SMITH, N. H. et al. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: Clonal expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15271–15275, 2003.

SMITH, N. H. et al. Bottlenecks and broomsticks: The molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 670–681, 2006a.

SMITH, N. H. et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Theoretical Biology**, v. 239, n. 2, p. 220–225, 2006b.

SMITH, N. H. et al. European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1340–1351, 2011.

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

SMITTIPAT, N. et al. Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, Oct 2005.

SMITTIPAT, N.; PALITTAPONGARNPIM, P. Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 80, n. 2, 2000.

SOLA, C. et al. Tuberculosis in the Caribbean: Using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, May-Jun 1999.

SOUZA-FILHO, A. F. et al. Genetic profiles of *Mycobacterium bovis* from a cattle herd in southernmost Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, 2016.

SUN, Z. et al. Evaluation of Spoligotyping and MIRU-VNTR for *Mycobacterium bovis* in Xinjiang, China. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 2, Apr 2012.

SUPPLY, P. **Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis***. Lille: Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille: 73 p. 2005.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, DEC 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762–771, 2003.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F., et al (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993. p.26-50.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. In: Veterinary Microbiology, 2–4 SPEC. ISS., **Anais...**2006.

TORTOLI, E. Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: Many doubts, few certainties. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, Jun 2012.

WARREN, R.M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

WENIGER, T. et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W326-W331, Jul 2010.

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

van BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, Jun 1998.

van EMBDEN, J. D. A. et al. Strain identification of *Mycobacterium-tuberculosis* by DNA fingerprinting - recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, FEB 1993 .

VELOSO, F. P. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3659–3672, 2016.

VENDRAME, F. B. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3639–3646, 2016.

ZIMPEL, C. K. et al. Complete genome sequencing of *Mycobacterium bovis* SP38 and comparative genomics of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 2017.

ZUMARRAGA, M. J. et al. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, Feb 1999.

ZUMÁRRAGA, M. J. et al. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 9–21, 2013.