ELEINE KUROKI ANZAI

**Sequenciamento do Genoma Completo do *Mycobacterium bovis* como
instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina**

São Paulo
2019

ELEINE KUROKI ANZAI

Sequenciamento do Genoma Completo do *Mycobacterium bovis* como instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

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. 3792
FMVZ

Anzai, Elaine Kuroki
Sequenciamento do Genoma Completo do *Mycobacterium bovis* como instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina / Elaine Kuroki Anzai. – 2019.
40 f. : 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. José Soares Ferreira Neto.

1. Sequenciamento do Genoma Completo. 2. cgMLST. 3. *Mycobacterium bovis*. 4. Bovinos. 5. Santa Catarina, Brasil. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Whole Genome Sequencing of Mycobacterium bovis as a Surveillance System tool in the State of Santa Catarina.", protocol number CEUAX 8894190219 (ID 001074), under the responsibility José Soares Ferreira Net, 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 March 07, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Sequenciamento do genoma completo do Mycobacterium bovis como instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina.", protocolado sob o CEUAX nº 8894190219, sob a responsabilidade de José Soares Ferreira Net, 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 07 de março de 2019.

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: ANZAI, Eleine Kuroki Anzai

Título: **Sequenciamento do Genoma Completo do *Mycobacterium bovis* como instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Yoshio Anzai e Marie Kuroki Anzai, pelo amor, incentivo e por apoiarem as minhas escolhas, tornando possível a realização dos meus sonhos.

Ao meu esposo, Alessandro Conrado Oliveira Silveira, pela amizade, carinho e paciência e, por tornar possível toda esta experiência profissional e acadêmica durante este período do Doutorado Sanduíche.

À minha irmã, Evelyn Kuroki Anzai, pela amizade e por poder compartilhar todos esses momentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Soares Ferreira, pela grande oportunidade em fazer o Doutorado em um Programa de Pós-Graduação considerado de excelência. Pela orientação, paciência e incentivo em tornar possível a realização do Doutorado Sanduíche no exterior.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, pela amizade, orientação e incentivo nos projetos de pesquisas.

Agradeço imensamente a todos os colegas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, à Gisele, Israel, Antônio, Cássia, Léia, Juliana, Osvaldo e Nicolas, pela amizade, ajuda no processamento das amostras, análises e cooperação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses e, especialmente ao Danival, pela paciência, colaboração e atenção em todos os momentos.

Aos Professores Wondwossen Gebreyes e Dra. Shu que me orientaram na Universidade Estadual de Ohio, Columbus, Ohio, EUA tornando possível a realização do Doutorado Sanduíche e a realização de umas das mais fantáticas experiências da minha vida. Aos colegas e novos amigos que pude conhecer durante este período nos Estados Unidos, Mostafa Ghanem, pela amizade, análises e ensinamentos, Kamila, Guilherme e Ricardo que tornaram este período no exterior, muito mais leve e divertido. A Profa. Luciana da Costa que nos acolheu no Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva, da Universidade Estadual de Ohio. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Lauro dos Santos, da Universidade Federal da Paraíba, pelo incentivo, apoio e pela ajuda incondicional para conseguir realizar o estágio na Universidade Estadual de Ohio.

A todos aqueles do Laboratório de Saúde Pública de Michigan, Lansing, EUA, especialmente a Dra. Martin e a Dra. Angie, que me acolheram no Laboratório de Micobactérias, tornando possível a realização do Sequenciamento do Genoma Completo. Aos colegas Rebecca, Laurel, Heather e Kourtney, pelo carinho, ensinamentos, empatia e amizade no período em que estive no Laboratório processando as amostras. Meu eterno agradecimento.

Aos colegas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA-SC) e da CIDASC, pelo apoio, amizade e conhecimento, que contribuíram na realização deste trabalho, especialmente nas coletas das amostras.

À Profa. Maria Luísa e à Mara da Universidade Federal de Santa Catarina, pelas análises e ensinamentos nas análises e processamento das amostras. Um agradecimento especial a Dr. Cássia e à Nina do Laboratório Santa Luzia, Florianópolis, pela amizade e pela utilização do laboratório de micobactérias e utilização do MALDI-TOF.

Meu especial agradecimento a Universidade Regional de Blumenau, pelo apoio e liberação para realizar o Doutorado.

Agradecimento especial à CAPES pelo bolsa concedida para a realização do Doutorado Sanduíche no Exterior.

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

RESUMO

ANZAI, E.K. **Sequenciamento do Genoma Completo do *Mycobacterium bovis* como instrumento de Sistema de Vigilância no Estado de Santa Catarina**. 2019. 40 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Apesar de vários países terem erradicado a tuberculose bovina, o seu combate tem sido desafiador. Existem várias razões para a infecção residual nesses locais e a dinâmica da transmissão do *Mycobacterium bovis* ainda é pouco compreendida. O rastreamento da transmissão recente e suas redes de transmissão são essenciais no controle da tuberculose bovina. No entanto, as ferramentas clássicas de genotipagem não possuem poder discriminatório para determinar as rotas de transmissão e a temporalidade do foco de tuberculose bovina em uma área geográfica. Recentemente, esta abordagem epidemiológica pode ser realizada pelo sequenciamento do genoma completo (WGS), porém ainda não padronizada para facilitar investigações maiores, abrangendo diferentes laboratórios ou rastreamento de focos de tuberculose bovina. Com base nisso, objetivou-se analisar o Sequenciamento do Genoma Completo pela técnica do cgMSLT como ferramenta de Vigilância da Tuberculose Bovina no Estado de Santa Catarina. Este estudo forneceu a primeira descrição sobre a diversidade filogenética de isolados de *M. bovis* do Brasil baseado na análise do cgMSLT. Além disso, é a primeira confirmação independente do esquema cgMLST para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, utilizada em isolados clínicos de *M. bovis* de amostras obtidas de bovinos com bTB, resultando -se na identificação de 11 Tipos de Complex. Na pesquisa atual, foi demonstrado que o conhecimento da epidemiologia combinado com dados do WGS pode fornecer um meio para investigações aprofundadas da dinâmica da bTB, destacando aspectos importantes e ainda não quantificados, como a extensão da transmissão entre espécies e a taxa de substituição. O custo decrescente, resolução adicional, e boa evidência com a localização espacial justificam o uso do WGS como ferramenta na vigilância da tuberculose bovina no Estado de Santa Catarina.

Palavras-chave: Sequenciamento do Genoma Completo, cgMLST, *Mycobacterium bovis*, bovinos, Santa Catarina, Brasil

ABSTRACT

ANZAI, E.K. **Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium bovis* as an Instrument of Surveillance System in the State of Santa Catarina**. 2019. 40 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Although several countries have eradicated bovine tuberculosis, their fight has been challenging. There are several reasons for the residual infection in these sites and the transmission dynamics of *Mycobacterium bovis* is still poorly understood. Screening of the recent transmission and its transmission networks are essential in the control of bovine tuberculosis. However, the classic genotyping tools do not have discriminatory power to determine the transmission routes and the temporality of the focus of bovine tuberculosis in a geographic area. Recently, this epidemiological approach can be performed by complete genome sequencing (WGS), but not yet standardized to facilitate larger investigations, covering different laboratories or tracing of outbreaks of bovine tuberculosis. Based on this, the objective was to analyze the Whole Genome Sequencing using the cgMSLT technique as a Bovine Tuberculosis Surveillance tool in the State of Santa Catarina. This study provided the first description on the phylogenetic diversity of *M. bovis* isolates from Brazil based on cgMSLT analysis. In addition, it is the first independent confirmation of the cgMLST scheme for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, used in clinical isolates of *M. bovis* from samples obtained from bovines with bTB, resulting in the identification of 11 Complex Types. In current research, it has been shown that knowledge of epidemiology combined with WGS data can provide a means for in-depth investigations of bTB dynamics, highlighting important but not yet quantified aspects such as the extent of transmission between species and the rate of substitution. The decreasing cost, additional resolution, and good evidence for spatial location justify the use of WGS as a tool in the surveillance of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina.

Keywords: Core genome MLST; Genotyping; Molecular epidemiology; *Mycobacterium bovis*; Whole genome sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos municípios do Estado de Santa Catarina participante da coleta de amostras que apresentaram animais reagentes para o Teste Cervical Comparado e encaminhados para o abate sanitário em 2016.	18
Figura 2 - Definição de cluster epidemiológico pela análise do WGS baseado nos valores de pontos de corte descritos por Kohl et al, 2018a e Meehan et al, 2018. Os limiares das distâncias entre alelos permitem definir casos relacionados e provavelmente ligados em torno de um animal index, estabelecidos com base na observação de variações máximas de 5 alelos (círculo azul claro) até 12 alelos (círculo azul). Os casos com distâncias de alelos que excedem o limiar de 12 alelos são considerados não relacionados. Esses limiares podem ser avaliados e possivelmente adaptados, dependendo dos contextos epidemiológicos e das populações locais.	22
Figura 3 - Distribuição geográfica dos 9 Tipos de Complex obtidos de focos de tuberculose bovina de 8 municípios de Santa Catarina que foram analisado pelo cgMLST. Os Tipos de Complex 15910 e 15914 eram isolados com a origem desconhecida, não sendo inseridas no mapa. A amostra 15904 (triângulo verde) e a amostra 15912 (marrom) ficaram sobrepostas por estarem localizadas na mesma propriedade.	26
Figura 4 - Análise de <i>Minimum spanning tree</i> para as 23 amostras clínicas de <i>M. bovis</i> baseada nos perfis de alelos de 12 genes de manutenção do <i>M. bovis</i> cgMLST usando o Software SeqSphere ⁺ . Os números nas linhas de conexão ilustram o número de genes alvo com diferentes alelos. As amostras com o mesmo tipo de sequência são representados com círculos sombreados. A distância da matriz subjacente foi construída a partir de todas as comparações de perfis alélicos em pares de 12 alvos do cgMLST, usando a opção sem valores em falta (<i>pairwise no missing values</i>). Não houve a falta de nenhum alelo. As amostras discutidas no texto estão codificadas por cores de acordo com a legenda na qual representa a origem dos animais.	27
Figura 5 - Dendograma da distribuição de 23 isolados de <i>M. bovis</i> procedentes de 8 municípios do Estado de Santa Catarina. As cores representam os municípios de origem dos animais.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação do esquema cgMLST construído a partir dos 23 isolados representando a diversidade filogenética do MTCB.....	24
Tabela 2 - Informações dos isolados deste estudo quanto a identificação da amostra, propriedade e município de origem, idade dos animais e tipo de complex (CT) obtido pelo cgMLST.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRAS	18
3.2 ISOLAMENTO e identificação do <i>Mycobacterium bovis</i>	19
3.3 SEQUECIAMENTO DO GENOMA COMPLETO	19
3.3.1 BIBLIOTECAS GENÔMICAS E SEQUENCIAMENTO	19
3.3.2 MONTAGEM E ANOTAÇÕES BASEADAS NO cgMLST	20
3.3.3 ANOTAÇÕES BASEADAS NO <i>M. bovis</i> – cgMLST	20
3.3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	21
3.3.5 DEFINIÇÃO DE CLUSTER PARA ANÁLISE DE GENOMA	21
4 DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis é o agente causador da tuberculose bovina (bTB) (OLEA-POPELKA et al., 2017). Além do seu potencial zoonótico, também é responsável por perdas econômicas na produção de carne e leite (THOEN; LOBUE; ENARSON, 2014; OLEA-POPELKA et al., 2017; POZO et al., 2019). Com a globalização dos mercados, emergem novos requisitos de saúde, obrigando a criação de áreas livres de doenças, estimulando a competitividade nos mercados mundiais.

Apesar de vários países terem erradicado a tuberculose bovina, o seu combate tem sido desafiador. A existência de reservatórios silvestres em alguns países, como o texugos europeus no Reino Unido, bisontes e alces no Canadá, búfalos africano na África do Sul e veados de cauda branca nos Estados Unidos (FITZGERALD; KANEENE, 2013; PALMER, 2013; AMATO et al., 2018; GORMLEY; CORNER, 2018; SALVADOR et al., 2019a); as características epidemiológicas da doença, tais como a transmissão de *M. bovis* por diferentes rotas de transmissão (ORLOSKI et al., 2018; POZO et al., 2019); desempenho limitado dos testes diagnósticos (BYRNE et al., 2017), são fatores que têm dificultado a eliminação de focos residuais bTB. No entanto, a falha na erradicação da doença geralmente é atribuída à persistência de *M. bovis* nos próprios bovinos e a estratégias equivocadas de vigilância adotadas pelos países (BIEK et al., 2012; TREWBY et al., 2016).

No Brasil, o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) foi estabelecido com o objetivo de diminuir a prevalência e a incidência da brucelose e tuberculose visando a erradicação dessas doenças (MAPA, 2017). O estudo da situação epidemiológica da tuberculose bovina, entre 2003 e 2015, com cobertura de 75% do rebanho brasileiro, demonstrou uma variação nos índices de prevalência entre 0,36 a 9,0% em diferentes Estados do Brasil (BAHIENSE et al., 2016; BARBIERI et al., 2016; SILVA et al., 2016; VELOSO et al., 2016; VENDRAME et al., 2016; FERREIRA NETO et al., 2016; GALVIS et al., 2016; GUEDES et al., 2016; LIMA et al., 2016; NÉSPOLI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; ROCHA et al., 2016).

No Estado de Santa Catarina, a prevalência de focos de tuberculose bovina foi de 0,50%, enquanto a prevalência de bTB em animais foi de 0,06%. Os resultados mostraram que a doença está mais concentrada nas propriedades leiteiras, com sofisticação de seu modo de produção e maior número de animais, ou seja, nas propriedades leiteiras de alta

produção (FERREIRA NETO et al., 2016). Adicionalmente, a introdução de animais também emergiu como um fator de risco importante para a bTB no Brasil (FERREIRA NETO et al., 2016).

A genotipagem por spoligotyping e MIRU-VNTR tem sido amplamente utilizada como ferramenta de epidemiologia molecular das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (CARVALHO et al., 2016; HAUER et al., 2016; ARMAS et al., 2017; GHAVIDEL et al., 2018). No entanto, apesar destes métodos de genotipagem terem se mostrado úteis para identificar agrupamentos locais, há limitações em seu poder de discriminar eventos dentro de agrupamentos envolvidos na persistência de focos e na sua capacidade de elucidar o espalhamento da tuberculose bovina (TREWBY et al., 2016).

O sequenciamento do genoma completo (*Whole genome sequencing* – WGS) tem demonstrado grande potencial para a investigação epidemiológica da tuberculose bovina e melhor poder discriminatório quando comparada com as técnicas de genotipagem clássica (BRUNING-FANN et al., 2017; SANDOVAL-AZUARA et al., 2017; GHEBREMARIAM et al., 2018; LASSERRE et al., 2018; PRICE-CARTER et al., 2018; SALVADOR et al., 2019). O WGS fornece uma identificação altamente precisa das diversas linhagens do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e a detecção abrangente das variantes genômicas mediadoras de resistência a drogas (KOHL et al., 2014; MERKER et al., 2017).

O WGS também levou a um crescimento significativo na metodologia quantitativa. Com isso, as análises do WGS também permitem estimar escalas temporais de epidemias de TB (Tuberculose) com base no cálculo das taxas de evolução do genoma e datação dos isolados das populações estudadas, contribuindo na exploração de uma ampla gama de aplicações genômicas evolutivas e comparativas. Sobretudo, fornecendo uma estimativa robusta das relações filogenéticas e temporais entre os isolados (KOHL et al., 2014, 2018a; MERKER et al., 2017; MEEHAN et al., 2018; O'TOOLE, 2018). Todos esses aspectos são essenciais para a melhor compreensão da dinâmica espacial recente e histórica da tuberculose bovina (POZO et al., 2019).

A possibilidade de monitorar mutações no genoma bacteriano permite rastrear o espalhamento da doença entre animais e propriedades e estruturar modelos de redes de contatos entre as populações. A combinação de conhecimentos epidemiológicos com os dados do WGS tem sido estratégica para as investigações sobre a dinâmica da tuberculose bovina, destacando aspectos importantes e ainda não quantificados, como a extensão da transmissão entre as espécies e a taxa de substituição (ORLOSKI et al., 2018; PRICE-CARTER et al., 2018; SALVADOR et al., 2019a). A técnica de WGS tem sido utilizada

como estratégia de vigilância para a erradicação, visando o rastreamento de focos e estudos epidemiológicos no Reino Unido (BIEK et al., 2012; TREWBY et al., 2016), Estados Unidos (BRUNING-FANN et al., 2017; ORLOSKI et al., 2018; SALVADOR et al., 2019b), Nova Zelândia (CRISPELL et al., 2017; PRICE-CARTER et al., 2018) e Alemanha (KOHL et al., 2018c).

Apesar das vantagens das análises baseadas no WGS, há várias limitações na aplicação dessa técnica em larga escala. Uma delas é a ausência da padronização das anotações (*pipelines*), levando a problemas de interpretação de resultados baseados na similaridade em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Além disso, a nomenclatura básica do WGS ainda não está padronizada, dificultando o cotejamento de informações produzidas por diferentes laboratórios e grupos de pesquisadores, característica necessária para a disseminação da metodologia (KOHL et al., 2018a; O'TOOLE, 2018).

Recentemente, uma abordagem de tipagem de sequência multilocus do core genoma (*core genome MLST* - cgMLST) foi proposta como um método padrão reproduzível para a diferenciação de linhagem baseada em WGS na investigação epidemiológica de diversos patógenos tais como *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Enterococcus faecalis* e *Brucella* spp. (KOHL et al., 2014, 2018b; CODY et al., 2017; HIGGINS et al., 2017; PARK et al., 2017; GHANEM et al., 2018; PATIÑO et al., 2018; SCHÜRCH et al., 2018; NEUMANN et al., 2019; SANKARASUBRAMANIAN et al., 2019).

cgMLST é a técnica de WGS de alelos gene por gene, que inicialmente foi desenvolvido para sequência de seis ou sete genes *house-keeping* usados no *multi locus sequence typing* (MLST), e agora ampliado para o nível genômico. A maior vantagem de se utilizar genomas inteiros é o poder de discriminação entre linhagens, permitindo a geração de filogenias robustas (KOHL et al., 2014, 2018b; O'TOOLE, 2018).

Geralmente, as populações bacterianas têm estruturas populacionais diferentes, variando de clonal a extremamente variável (MAIDEN et al., 1998; JOLLEY; MAIDEN, 2014). Essa estrutura variável é resultante da natureza diversa dos genomas bacterianos e de suas diferentes propriedades. Portanto, nem todos os genes bacterianos dentro de uma determinada espécie podem ser alvos de tipagem padronizada. Segundo Smith et al. (2006), consideramos como complexo clonal em micobacteriose, o grupo de estirpes derivadas de um ancestral comum recente que compartilha vários alelos em loci filogeneticamente informativos. Um complexo clonal geralmente inclui o genótipo

ancestral e estirpes com pequena variação. Essa definição é altamente subjetiva. Neste caso, um complexo clonal é definido em termos de linhagens que apresentam padrões de espilogotipos estreitamente relacionados.

Consequentemente, os genes essenciais (*core genes*), mais conservados, compartilhados entre todas as estirpes de uma determinada espécie, são considerados mais adequados como genes alvos para o desenvolvimento de um método de tipagem padrão (MAIDEN et al., 2013; JOLLEY; MAIDEN, 2014; MERKER et al., 2017). A combinação dos números de alelos obtidos do core genoma define uma sequência tipo (ST), que constitui um dispositivo portátil e identificador genético universal da estirpe e dos complexos clonais (MAIDEN et al., 2013; JOLLEY; MAIDEN, 2014). As sequências de alelos são otimamente armazenados em uma plataforma, acessíveis na Web e ao público (MAIDEN et al., 2013; JOLLEY; MAIDEN, 2014; KOHL et al., 2018b; O'TOOLE, 2018)

O cgMLST tem demonstrado ser um método eficiente, preciso e reproduzível para diferenciação entre estirpes e isolados de campo da mesma espécie com nomenclatura estável e padronizável (KIMURA, 2018). Isso permite comparar isolados de diferentes focos e compartilhar os resultados de digitação entre diferentes laboratórios por meio de bancos de dados baseados na web (KOHL et al., 2014, 2018b; O'TOOLE, 2018).

Recentemente, um esquema cgMLST foi desenvolvido para o genoma do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, usando um conjunto de 45 estirpes que cobrem a diversidade conhecida do CMTB (KOHL et al., 2014, 2018b). Esta ferramenta melhorada do cgMLST, consistindo de 2891 genes, mostrou sua aplicabilidade a toda a diversidade de CMTB quando usada em um conjunto abrangente de estirpes de referência (KOHL et al., 2018b). Para permitir seu uso na vigilância de CMTB, foi definido limiares críticos para eventos de prováveis transmissões recentes (no máximo cinco alelos distintos) e provável relação entre os focos (< 12 alelos distintos), com base na taxa evolutiva de alteração do alelo e na correlação com dados de genotipagem clássica (KOHL et al., 2014, 2018a). Um servidor central de nomenclatura baseado na web (<http://www.cgmlst.org/mtbc>) foi estabelecido como pré-requisito necessário para o uso padronizado do esquema cgMLST para genotipagem unificada em diferentes laboratórios. A definição de um tipo de complex baseado em cgMLST, permite facilitar ainda mais a comunicação em situações de foco, como o recente surto de tuberculose humana confirmado de uma estirpe de CMTB resistente a múltiplos medicamentos entre os refugiados da Somália na União Européia (WALKER et al., 2018). Finalmente, o servidor de alelos cgMLST baseado na web

forneceu uma nomenclatura de alelos universalmente harmonizada e geração de genótipos cgMLST comparáveis em uma escala global (KOHL et al., 2018b)

Até o momento, a aplicação do cgMLST só foi descrita utilizando-se genomas de *M. bovis* de referência e não em isolados clínicos de animais com tuberculose bovina. Em consequência de tais constatações, optou-se pela extensão da análise de todos os alelos neste estudo, técnica conhecida como MSLT do core genoma (cgMLST) como ferramenta de vigilância dos isolados clínicos de *M. bovis* do Estado de Santa Catarina.

O WGS tem sido aplicado para a melhor compreensão da epidemiologia das infecções, principalmente na identificação de genótipos indistinguíveis por outros métodos de genotipagem. O cgMLST oferece uma oportunidade de aproveitar o avanço da tecnologia de sequenciamento de nova geração na epidemiologia da tuberculose bovina aplicada em níveis locais e globais. A habilidade de identificar a introdução de uma nova cepa e traçar o ponto de origem de infecção, pode facilitar o serviço de vigilância da tuberculose bovina (CRISPELL et al., 2017; ORLOSKI et al., 2018; PRICE-CARTER et al., 2018). Especialmente em regiões com baixa prevalência da doença como o Estado de Santa Catarina, Brasil, em que os Sistemas de Vigilância para detecção e saneamento desses focos residuais são a melhor alternativa para o progresso na erradicação da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o Sequenciamento do Genoma Completo como ferramenta de Vigilância da Tuberculose Bovina no Estado de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar os genomas de *Mycobacterium bovis* utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração;
- Analisar as anotações baseadas no cgMLST de isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* do Estado de Santa Catarina;
- Determinar a diversidade genética comparando as sequências do genoma completo (WGS) de isolados de *M. bovis*;
- Realizar uma análise filogenética da tuberculose bovina em Santa Catarina, utilizando o software Ridom Seqsphere para análise cgMLST dos dados de WGS;
- Interpretar os clusters da análise dos genomas de *M. bovis* por meio do cgMLST;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

No período de abril a dezembro de 2016 foi realizado o monitoramento nas linhas de inspeção durante o abate sanitário em um matadouro-frigorífico com Serviço de Inspeção Federal, localizado no Estado de Santa Catarina, Brasil. Aproximadamente 5-10 gramas de tecidos apresentando lesões granulomatosas foram coletadas de 30 animais, provenientes de 10 propriedades, localizadas em nove municípios da região Oeste e Sul do Estado de Santa Catarina (Figura 1). Todos os animais abatidos eram reagentes no Teste Cervical Comparativo, utilizado como teste confirmatório conforme descrito por MAPA (2017). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS – FMVZ/USP) e armazenadas a -20°C até o processamento do isolamento bacteriano.

Figura 1 - Distribuição geográfica dos municípios do Estado de Santa Catarina participante da coleta de amostras que apresentaram animais reagentes para o Teste Cervical Comparado e encaminhados para o abate sanitário em 2016.

3.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium bovis*

As amostras foram processadas individualmente e submetidas ao processo de descontaminação com cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC) (CORNER; TRAJSTMAN, 1988), e semeadas em meio Stonebrink-Lessie e Löwestein-Jensen (Centro Panamericano de Zoonose, 1985). Em seguida foram incubadas a 37 °C por até 90 dias e observados semanalmente. Colônias de morfologia e características compatíveis com micobactérias foram coradas pelo método Ziehl-Neelsen (Centro Panamericano de Zoonose, 1972) para pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). O DNA genômico usados nas análises de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) foi extraído por meio de termólise (MAZARS et al., 2001), obtido por ressuspensão de colônias de micobactérias em 200µl de Tris-HCL (10 mM) e EDTA (1 mM) em pH 7,0, seguido de incubação a 95 °C por 45 min. Após centrifugação da suspensão a 12.000g por 7 min, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -20 °C até a utilização posterior.

A identificação molecular de micobactérias por meio da PCR foi realizada conforme descrito por Wilton e Cousins (1992). Posteriormente, a análise de deleção foi realizada nos isolados utilizando primers para a região de RD4 como descrito previamente para a identificação de *M. bovis* (WARREN et al., 2006).

3.3 SEQUECIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

3.3.1 BIBLIOTECAS GENÔMICAS E SEQUENCIAMENTO

Os extraídos de DNA foram quantificados pelo método fluorimétrico Qubit (Invitrogen, EUA). As bibliotecas do sequenciamento de nova geração (*paired-end*) foram preparadas usando os kits de preparação de biblioteca de DNA Illumina Nextera XT conforme os protocolos do fabricante (Illumina, Inc., São Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado em um Illumina Miseq (Illumina, Inc., São Diego, CA) no Laboratório de Micobactérias do Departamento de Saúde Pública de Michigan (Michigan Department of Health and Human Services - MDHHS), Lansing, Michigan, Estados Unidos. Todos os isolados foram sequenciados com taxa de cobertura acima de 20x.

3.3.2 MONTAGEM E ANOTAÇÕES BASEADAS NO cgMLST

A qualidade das leituras em bruto (*reads*) foi avaliada usando o software FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/, BabrahamBioinformatics, Cambridge, Reino Unido). Os *reads* foram trimados em 5' e 3' até que a qualidade média fosse igual a 30 em uma janela de 20 bases. Os *reads* foram mapeados (*reference mapping*) usando como referência o genoma SP38 (Número de acesso: NZ_CP015773.2) usando software BWA_SW versão 0.6.1 (LI; DURBIN, 2010). A montagem e anotação do cgMLST foi realizada por meio do software Ridom SeqSphere⁺ Versão 4.1.8 / 9 (Ridom GmbH, Münster, Alemanha) com parâmetros padrão e com 2891 genes alvos consultados para as cepas do Complexo *Mycobacterium* (cgMLST.org server), contendo 2.86 milhões de bases, como descrito anteriormente por Kohl et al, 2018b. Os genomas que não tiveram cobertura acima de 95% dos genes alvo (*good targets*) de 2891 genes cgMLST e com um mínimo de 20x a cobertura total foram eliminados do estudo. As análises foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas (IDMEL) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Ohio, Columbus, Ohio, Estados Unidos.

3.3.3 ANOTAÇÕES BASEADAS NO *M. bovis* – cgMLST

A primeira etapa do desenvolvimento do esquema cgMLST foi definir os genes dos core genoma que serviram como alvo. Foi utilizado o software SeqSphere⁺ Versão 4.1.8/9 (Ridom GmbH, Münster, Alemanha) para o desenvolvimento do core genoma. O SeqSphere⁺ é um software comercial e amigável (*friendly software*) que adaptou o conceito convencional do MLST e desenvolveu a plataforma de tipagem do genoma completo baseado em alelos gene por gene, podendo ser usada pela equipe laboratorial com ou sem conhecimentos prévios de bioinformática. A escolha do software foi devido ao fornecimento de uma abordagem mais robusta, detalhada e altamente personalizável para a definição dos alvos do core genoma. Neste estudo, adotou-se como referência (*reference mapping*) o genoma da estirpe de *M. bovis* SP38 (GenBank ID: NZ_CP015773.2) isolada no Brasil, categorizada como Complexo Clonal Europeu 2, SB0121 (ZIMPEL et al., 2017). A cepa SP38 foi escolhida por ser a primeira e única estirpe brasileira, até o momento deste estudo, a ter o mapeamento total do genoma completo. Com o objetivo de se desenvolver um esquema estável de cgMLST como ferramenta na investigação de

múltiplos focos de tuberculose bovina em municípios do Estado de Santa Catarina e servir como um marcador possivelmente geográfico do *Mycobacterium bovis* no Brasil.

3.3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética foi gerada usando os métodos *Neighbor Joining* (NJ) e o logaritmo *Minimum Spanning Tree* do cgMLST foram calculados e desenhados com o software SeqSphere+ (Ridom GmbH, Münster, Alemanha). Para estimar os limites de distância do alelo para a provável transmissão do *M. Bovis*, exportamos do SeqSphere + os perfis alélicos do cgMLST para análise posterior.

3.3.5 DEFINIÇÃO DE CLUSTER PARA ANÁLISE DE GENOMA

Para permitir seu uso na vigilância de MTCB, foi definido os pontos de corte por meio da diferença de alelos de 1, 5 e 12, respectivamente, focos altamente relacionados (1 alelo), eventos com prováveis transmissões recentes (no máximo 5 alelos distintos) e provável relação entre os focos (< 12 alelos distintos) conforme descrito por Kohl et al, (2018a); Meehan et al. (2018) (Figura 2). Estes limiares foram estabelecidos de acordo com o nível máximo sugerido recentemente da variação do genoma entre estirpes nas cadeias de transmissão recentes do MTBC (KOHL et al., 2014, 2018a; MERKER et al., 2017; MEEHAN et al., 2018). O cgMLST baseado na árvore de extensão mínima (*Minimum Spanning Tree*) foi calculado e desenhado com o software Ridom SeqSphere+. A presença de um servidor cgMLST de cepas do Complexo *Mycobacterium Tuberculosis* (<http://www.cgmlst.org/mtbc>) também permitiu padronizar a tipagem baseada na nomenclatura dos alelos do cgMLST. Assim, se uma nova sequência genética foi detectada, um novo número de alelo foi atribuído e os dados foram armazenados no banco de dados. O servidor de nomenclatura cgMLST permitiu agrupar os perfis cgMLST intimamente relacionados em Tipos do Complex (*Complex Type*) (CT; atualmente 13.433) com um limiar de 12 alelos distintos. Além do conjunto de genes cgMLST, o servidor também hospeda um conjunto de 755 genes adicionais do genoma acessório. A interface web do servidor permite pesquisar as estirpes através de uma identidade (ID) de amostra, ID cgMLST.org, cgMLST CT, ano de coleta, país de isolamento, ID PubMed, acesso NCBI ou ano de submissão. Atualmente, o servidor de nomenclatura hospeda perfis

alélicos cgMLST de 35.418 estirpes de MTCB (KOHL et al., 2018a). No momento, o servidor pode ser consultado usando apenas o software SeqSphere +.

Figura 2 - Definição de cluster epidemiológico pela análise do WGS baseado nos valores de pontos de corte descritos por Kohl et al, 2018a e Meehan et al, 2018. Os limiares das distâncias entre alelos permitem definir casos relacionados e provavelmente ligados em torno de um animal index, estabelecidos com base na observação de variações máximas de 5 alelos (círculo azul claro) até 12 alelos (círculo azul). Os casos com distâncias de alelos que excedem o limiar de 12 alelos são considerados não relacionados. Esses limiares podem ser avaliados e possivelmente adaptados, dependendo dos contextos epidemiológicos e das populações locais.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium bovis*

Foram processadas e analisadas 30 amostras de lesões granulomatosas sugestivas de TB obtidas de carcaças bovinas durante abate sanitário em um frigorífico com SIF no Estado de Santa Catarina. Do total de amostras processadas, 30 (100%) apresentaram crescimento de colônias com características compatíveis com as de *M. bovis*, revelaram-se BAAR quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, confirmadas como *M. bovis* pela RD PCR Multiplex.

4.2 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

Vinte e três dos 30 isolados apresentaram qualidade da sequência suficiente para a análise do cgMLST e foram incorporados no estudo filogenético. As amostras selecionadas apresentaram porcentagem de genes alvos acima de 96,1%, taxa de cobertura acima de 20 (Tabela 1). Resultando-se na análise de 23 isolados de *M. bovis* distribuídos em 10 propriedades de 8 municípios diferentes, e 3 amostras com dados de localização desconhecidos (Tabela 2).

Tabela 1 - Avaliação do esquema cgMLST construído a partir dos 23 isolados representando a diversidade filogenética do MTCB.

ID da amostra	Porc. Genes Alvos ¹ (<i>Good Targets</i>)	Taxa de Cobertura (Montagem)	#Missing values in <i>Distance Columns</i>
MB_LA_SC_15	98.1	111	66
MB_LA_SC_11	98.0	105	68
MB_GU_SC_05	98.0	88	78
MB_SM_SC_29	98.0	117	57
MB_SM_SC_27	98.0	49	66
MB_PA_SC_17	98.0	102	77
MB_SL_SC_06	98.0	116	58
MB_TM_SC_13	97.9	80	59
MB_LA_SC_14	97.9	68	58
MB_TM_SC_10	97.9	80	63
MB_LA_SC_12	97.9	90	77
MB_GU_SC_08	97.9	115	56
MB_GU_SC_03	97.8	72	59
MB_BE_SC_20	97.8	48	61
MB_UN_SC_30	97.7	49	60
MB_PA_SC_18	97.7	51	60
MB_GU_SC_01	97.7	55	66
MB_UN_SC_31	97.6	35	70
MB_PA_SC_16	97.6	64	61
MB_SJ_SC_28	97.3	25	62
MB_GU_SC_02	97.3	21	57
MB_PA_SC_19	97.3	31	65
MB_UN_SC_33	96.1	23	114

¹Porcentagem de genes cgMLST preenchendo critérios de qualidade

4.3 Genotipagem baseada em cgMLST do *M. bovis* e relações filogenéticas

Os metadados de cada amostra foram enviados para o banco de dados da plataforma cgMLST, sendo compartilhado como hospedeiro bovino ao servidor. Foram agrupados 11 diferentes Tipo de Complex (CT) para os 23 isolados de *M. bovis* do Estado de Santa Catarina (Tabela 2). Todas as amostras apresentaram novos CT do cgMLST e não foram encontrados anteriormente no banco de dados.

Tabela 2 - Informações dos isolados deste estudo quanto a identificação da amostra, propriedade e município de origem, idade dos animais e tipo de complex (CT) obtido pelo cgMLST.

ID da amostra	Propriedade de origem	Município de origem	Idade dos animais	Tipo de Complex (CT)
MB_PA_SC_16	propriedade 1	Paraíso	5a 2m	15904
MB_PA_SC_17	propriedade 1	Paraíso	5a 2m	15912
MB_PA_SC_18	propriedade 1	Paraíso	6a 11m	15904
MB_PA_SC_19	propriedade 1	Paraíso	1 ano	15904
MB_GU_SC_02	propriedade 2	Guaraciaba	9a 7m	15907
MB_GU_SC_03	propriedade 2	Guaraciaba	4a 5m	15907
MB_GU_SC_01	propriedade 3	Guaraciaba	5a 4m	15909
MB_GU_SC_05	propriedade 3	Guaraciaba	11m	15907
MB_GU_SC_08	propriedade 3	Guaraciaba	4a 4m	15909
MB_SL_SC_06	propriedade 4	São Lourenço do Oeste	desconhecido	15907
MB_TM_SC_13	propriedade 5	Treze de Maio	3a 10m	15911
MB_TM_SC_10	propriedade 6	Treze de Maio	6a 3m	15911
MB_LA_SC_11	propriedade 7	Lacerdópolis	5a 7m	15908
MB_LA_SC_12	propriedade 7	Lacerdópolis	3a 8m	15908
MB_LA_SC_14	propriedade 7	Lacerdópolis	3a	15908
MB_LA_SC_15	propriedade 7	Lacerdópolis	3a 8m	15908
MB_BE_SC_20	propriedade 8	Belmonte	5a 11m	15913
MB_SM_SC_27	propriedade 9	São Miguel do Oeste	1a 7m	15905
MB_SM_SC_29	propriedade 9	São Miguel do Oeste	3a 8m	15906
MB_SJ_SC_28	propriedade 10	São João do Oeste	7a 1m	15905
MB_UN_SC_30	desconhecido	desconhecido	desconhecido	15905
MB_UN_SC_31	desconhecido	desconhecido	desconhecido	15910
MB_UN_SC_33	desconhecido	desconhecido	desconhecido	15914

Para visualizar a estrutura populacional precisa e a dispersão dos isolados de agrupamento, foram construídos uma árvore filogenética utilizando o método *Minimum Spanning Tree* (MST) e um dendograma pelo método de *Neighbor Joining* (NJ) com base nas informações alélicas de 2715 genes sem valores em falta (*no missing values*), em um cgMLST para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) com 2891 genes alvos. Foram excluídos 176 genes alvos para a construção da árvore e do dendograma, pois estavam ausentes em pelo menos uma amostra. Com isto, resultou o número muito pequeno de diferenças alélicas entre os isolados.

A análise de agrupamento pelo cgMLST distinguiu os 23 isolados dos focos de tuberculose bovina em 8 municípios de Santa Catarina (Figura 3). De acordo com a definição de até 12 alelos diferentes como ponto de corte (KOHL et al., 2014, 2018b; MEEHAN et al., 2018), quatro agrupamentos apresentavam transmissão recente (< 5 alelos

diferentes), dois focos com provável relação (< 12 alelos diferentes) e um foco com as cepas apresentando a mesma sequência de alelos (Figura 4).

Figura 3 - Distribuição geográfica dos 9 Tipos de Complex obtidos de focos de tuberculose bovina de 8 municípios de Santa Catarina que foram analisado pelo cgMLST. Os Tipos de Complex 15910 e 15914 eram isolados com a origem desconhecida, não sendo inseridas no mapa. A amostra 15904 (triângulo verde) e a amostra 15912 (marrom) ficaram sobrepostas por estarem localizadas na mesma propriedade.

Quando considerada a concordância da genotipagem pelo cgMLST com os dados de rastreamento, o agrupamento aconteceu entre a maioria dos animais situados na mesma propriedade ou município (Figura 4 e Figura 5). Os isolados dos municípios de Paraíso, Guaraciaba, São Miguel do Oeste e Lacerdópolis foram intimamente relacionados com os outros isolados da mesma propriedade ou dos isolados do mesmo município, apresentando uma distância de dois alelos. Isso indica uma relação epidemiológica entre os animais e um possível envolvimento em uma cadeia de transmissão recente. Nenhuma diferença foi detectada na sequência dos genomas do isolados do município de Treze de Maio (MB_TM_SC_10 e MB_TM_SC_13), demonstrando que são cepas praticamente iguais (Figura 4).

Figura 4 – Análise de *Minimum spanning tree* para as 23 amostras clínicas de *M. bovis* baseada nos perfis de alelos de 12 genes de manutenção do *M. bovis* cgMLST usando o Software SeqSphere⁺. Os números nas linhas de conexão ilustram o número de genes alvo com diferentes alelos. As amostras com o mesmo tipo de sequência são representados com círculos sombreados. A distância da matriz subjacente foi construída a partir de todas as comparações de perfis alélicos em pares de 12 alvos do cgMLST, usando a opção sem valores em falta (*pairwise no missing values*). Não houve a falta de nenhum alelo. As amostras discutidas no texto estão codificadas por cores de acordo com a legenda na qual representa a origem dos animais.

A genotipagem pelo cgMLST também demonstrou que 3 isolados (MB_SJ_SC_28; MB_UN_SC_30 e MB_SM_SC_27) pertenciam de fato ao mesmo foco, mesmo sem prévia ligação epidemiológica estabelecida a partir do rastreamento de contato clássico. A distância máxima de dois alelos demonstrou que esses isolados estavam intimamente relacionados, indicando envolvimento em uma cadeia de transmissão recente, mesmo pertencendo a municípios diferentes (São Lourenço do Oeste, local indefinido e São Miguel do Oeste).

Figura 5 - Dendrograma da distribuição de 23 isolados de *M. bovis* procedentes de 8 municípios do Estado de Santa Catarina. As cores representam os municípios de origem dos animais.

4 DISCUSSÃO

Este estudo obteve a primeira descrição sobre a diversidade filogenética de isolados de *M. bovis* do Brasil baseado na análise do cgMLST. Ademais, é a primeira confirmação independente do esquema cgMLST para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* descrita por Kohl et al, 2018, utilizada em isolados clínicos de *M. bovis* de amostras obtidas de bovinos com bTB.

O método gene por gene MLST tem sido usado previamente na resolução de focos e nas investigações epidemiológicas de patógenos humanos, assim como naqueles relacionados ao *M. tuberculosis* (MAIDEN et al., 2013; KOHL et al., 2018b; JONES et al., 2019). Especificamente, o esquema gene por gene cgMLST do software Ridom SeqSphere tem sido utilizado em focos de tuberculose humana, e consiste numa plataforma de dados do WGS padronizada e portátil na pesquisa da CMTB (KOHL et al., 2018b; O'TOOLE, 2018; JONES et al., 2019).

Foram agrupados 11 diferentes Tipos de Complex (CT) para os 23 isolados de *M. bovis* do Estado de Santa Catarina. Todas as amostras apresentaram novos CT do cgMLST e não foram encontrados anteriormente no banco de dados. No entanto, a aplicação cgMLST para *M. bovis* foi previamente descrita adotando-se apenas genomas de referência (KOHL et al., 2014, 2018b). Sendo assim, até o momento, este é o primeiro estudo descrevendo a aplicação da plataforma cgMLST e o software Ridom SeqSphere em isolados de *M. bovis*, com sua análise filogenética da tuberculose bovina em uma região geográfica.

Por meio da análise baseada do WGS, é possível determinar os possíveis disseminadores, correspondentes aos casos particularmente contagiosos, na população investigada (WALKER et al., 2013a, 2013b, 2014; ABASCAL et al., 2019). A presença desses casos é sugerida pela detecção de padrões dos nós na árvore filogenética baseada em WGS, usando algoritmos que permitem identificar nós hipotéticos e redes, indicando múltiplos casos secundários originários de um mesmo nó ou caso index. Podemos verificar a formação desses nós e suas redes de transmissão nos municípios de Paraíso, Lacerdópolis, Guaraciaba, e do isolado com origem desconhecida (MB_UN_SC_30). Dessa forma, o rastreamento e o cronograma das cadeias de transmissão recentes permitem que os programas de controle da bTB identifiquem de maneira eficaz os *hotspots* de transmissão e empreguem medidas de intervenção direcionadas a esses focos (MEEHAN et al., 2018).

O rastreamento da transmissão recente é frequentemente aplicado para obter uma melhor compreensão da atual dinâmica de transmissão de patógenos em uma determinada população, como no CMTB. Vários métodos com características específicas de desempenho existem para detectar cadeias de transmissão recentes, geralmente por agrupamentos de linhagens baseadas em semelhanças genotípicas. No entanto, há poucos dados disponíveis sobre o quão recente ocorreu um evento de provável transmissão quando medido por diferentes métodos de genotipagem (MERKER et al., 2017). Esses dados podem ser úteis para orientar investigações epidemiológicas, como por exemplo, alelos únicos adicionais podem indicar que existe um rebanho intermediário entre os focos (MERKER et al., 2017; BRITES et al., 2018; MEEHAN et al., 2018; SALVADOR et al., 2019b).

Recentemente, a relação entre tempo de transmissão e os métodos de genotipagem utilizados na epidemiologia de *Mycobacterium tuberculosis* foi descrita por Meehan et al. (2018). Os resultados sugerem que aglomerados baseados em spoligotyping poderiam abranger eventos de transmissão que ocorreram quase 200 anos antes da amostragem, enquanto MIRU-VNTR de 24 loci poderiam representar três décadas de transmissão. Entretanto, a genotipagem baseada em WGS, aplicando baixos limiares de SNP ou alelos no cgMLST, permite a determinação de eventos de transmissão recentes, e em intervalos de tempo de até 10 anos para o ponto de corte de 5 SNP/alelo, e de aproximadamente 5 anos para até 1 SNP/alelo (MEEHAN et al., 2018). Sendo assim, neste estudo, os agrupamentos com distância entre 1 a 5 alelos podem ser indicativos de uma cadeia de transmissão recente, ou seja, que ocorreu nos últimos 5 a 10 anos da coleta dessas amostras.

A identificação de 11 Tipos de Complex em 23 isolados de *M. bovis* demonstram uma ampla diversidade genotípica, sugerindo que fontes variadas de infecção podem estar contribuindo para o espalhamento da doença ou também indicar a presença de estirpes residuais de focos históricos. Segundo Bruning-Fann et al. (2017), a presença de altas taxas de infecções mistas no mesmo hospedeiro, causadas por mais de uma estirpe de *M. bovis* (ORLOSKI et al., 2018) e a taxa de mutação durante o período de latência tem sido consideradas nessa ampla diversidade alélica (COMAS, 2017). Contudo, os resultados do WGS corroboraram evidências investigativas de eventos de transmissão entre animais de um mesmo rebanho ou de um mesmo município. Sendo assim, foi verificado uma menor diversidade de alelos (< 5 alelos) entre rebanhos epidemiologicamente relacionados nos focos ocorrido em 2016 no Estado de Santa Catarina. Nesses agrupamentos, os resultados

do WGS demonstram evidências investigativas de eventos de transmissão recente e indicam a exposição a uma fonte de infecção comum, possivelmente o contato entre animais infectados (ORLOSKI et al., 2018).

A ocorrência estimada de alelos ou SNP por genoma do CMTB por ano varia de 0,15 (BIEK et al., 2012) a 0,53 (CRISPELL et al., 2017). Com base nessas estimativas do cálculo de mutação para os marcadores do CMTB, podemos indicar uma exposição comum para os isolados com cinco ou menos alelos, enquanto eventos de introdução não relacionados podem ser mais prováveis para isolados com distância de alelos > 5 (CRISPELL et al., 2017). Esta possível relação entre os focos e a possibilidade de transmissão recente foi verificada nos isolados do município de Paraíso, sendo que todas as amostras eram provenientes do mesmo rebanho e apresentaram diferença de apenas um alelo, como também nos isolados do município de Lacerdópolis (< 4 alelos).

A fonte original de *M. bovis* para o rebanho *index* não foi definida por meio dos dados epidemiológicos obtidos neste estudo, mas os resultados do WGS evidenciaram a possibilidade de transmissão do *M. bovis* entre rebanhos localizados em municípios diferentes. O mesmo Tipo de Complex (15907) foi identificado nas amostras provenientes das propriedades do município de Guaraciaba e São Lourenço do Oeste, demonstrando também uma possível relação entre estes focos. Além disso, apresentavam uma diferença de dois alelos, indicando uma possível transmissão recente. Da mesma forma, a relação entre os focos também foi verificada nos isolados obtidos de duas propriedades diferentes localizadas entre os municípios de São Miguel do Oeste, São Lourenço do Oeste e entre um isolado com origem desconhecida. Nesse caso, a evidência de movimentação animal ou a ocorrência de contato entre os animais envolvidos em cada cluster podem ser sugeridos.

Os alelos únicos observados entre animais dentro de um rebanho podem representar variação causada por transmissão animal a animal, ou uma mutação real da estirpe. Essa ampla gama de mutações genômicas é superior quando comparada à taxa de genótipos do MIRU-VNTR de 24 locus, ilustrando assim o poder de resolução mais alto de WGS em relação com a tipagem clássica (MERKER et al., 2017; MEEHAN et al., 2018). A presença de uma sequência idêntica de alelos foi verificada nos isolados provenientes de duas propriedades diferentes do município de Treze de Maio, em que não houve nenhuma diferença entre os alelos, ou seja, uma sequência de alelos idêntica. Sendo assim, podemos indicar que esses dois animais estavam altamente relacionados e apresentavam uma transmissão recente de *M. bovis*, apesar de pertencerem a propriedades diferentes dentro de um mesmo município.

Múltiplos fatores podem contribuir para o espalhamento da infecção de bovinos infectados com *M. bovis* sem a presença de um animal index. A presença de novilhos infectados (< 24 meses), nas propriedades de Paraíso, Guaraciaba e São Miguel do Oeste, podem sugerir a ingestão de colostro infectado por *M. bovis*. A adoção da pasteurização é reconhecida como método efetivo no controle do espalhamento do agente pelo leite. Recentes avanços na tecnologia tem permitido a pasteurização sem a destruição das imunoglobulinas essenciais, podendo ser armazenado e fornecido aos bezerros. O leite residual não pasteurizado foi umas das principais fonte de infecção nos focos de bTB em bovinos e carnívoros no Estado de Michigan, EUA, em 2013, e que foram investigados e rastreados por meio das análise do WGS (BRUNING-FANN et al., 2017).

Em geral, abordagens filogenéticas aplicadas a sequências do genoma completo, são recomendadas para investigar a dinâmica de transmissão dentro de uma população de estudo, permitindo explicar as condições específicas do rebanho, tais como baixa ou alta incidência de tuberculose e sua possível disseminação. O controle da movimentação dos animais associada ao conhecimento de origem e a avaliação das propriedades localizadas em áreas consideradas de risco para a reintrodução de animais com bTB constituem-se em medidas de prevenção na redução do espalhamento dessa enfermidade (PALMER et al., 2011). Assim, interromper a transmissão do *M. bovis* é fundamental para o controle da bTB. Portanto, há uma forte necessidade que o desenvolvimento das estratégias de controle mais eficientes sejam capazes de identificar de forma apropriada as cadeias de transmissão relevantes, os fatores de risco e os *hotspots*, e o cronograma robusto de quando os focos surgiram pela primeira vez (MEEHAN et al., 2018).

A baixa prevalência da bTB entre as populações de bovinos de Santa Catarina sugere que os rebanhos bovinos estejam atuando como o principal reservatório de *M. bovis* (Velooso et al., 2016). As medidas de controle adotadas, portanto, devem continuar sendo direcionadas para a erradicação da enfermidade nos rebanhos. Neste estudo, das 30 amostras coletadas durante abate sanitário de bTB, 29 eram provenientes de animais da região Oeste do Estado de Santa Catarina. Correlacionado-se com os resultados descritos por Velooso et al, 2016, em que os rebanhos leiteiros, mantidos em confinamento parcial ou total, e rebanhos maiores, que tendem a adquirir animais mais frequentemente, estão sob maior risco de tuberculose bovina. Sendo assim, um sistema de vigilância para tuberculose bovina deve ser orientado para as bacias leiteiras do Estado, em especial a região oeste, onde encontram-se as principais indústrias e a maioria das explorações leiteiras intensivas.

A medida que os métodos WGS se tornam mais comuns e mais fáceis de implementar em uma variedade de configurações, cada método de genotipagem pode ser empregado como parte de um programa geral de coleta de evidências relacionadas à transmissão. Além disso, pode contribuir nas abordagens epidemiológicas moleculares como parte integrante do rastreamento e da disseminação da bTB. A fonte de infecção é desconhecida para aproximadamente metade dos rebanhos afetados pela bTB, e os resultados da WGS neste estudo podem sugerir várias fontes possíveis, incluindo movimentação de bovinos não documentado, animal importado e utilização de produtos não pasteurizados como o colostro infectado por *M. bovis* fornecido coletivamente aos bezerros de um mesmo rebanho (PALMER et al., 2013; ORLOSKI et al., 2018).

O WGS demonstrou ser uma ferramenta considerável para a erradicação e controle da bTB, melhorando consideravelmente o poder discriminatório dos dados de tipagem molecular. Com a adoção dos métodos WGS na vigilância e rastreamento de focos, a orientação da seleção de métodos de agrupamento apropriados para descobrir cadeias de transmissão relevantes dentro de um determinado período de tempo podem ser sugeridas. As taxas de substituição estimadas pelo WGS tornaram-se essenciais como parte importante das estratégias de investigações epidemiológicas nos programas oficiais de controle e erradicação da tuberculose bovina em países como os Estados Unidos (BRUNING-FANN et al., 2017; ORLOSKI et al., 2018).

O cgMLST é um método relativamente novo. No entanto, tem a vantagem de ser um método mais simples e padronizado para analisar grandes quantidades de dados genômicos que são facilmente carregados em um banco de dados global para análise, usando software Ridom SeqShere, facilitando o uso da genômica para a vigilância da tuberculose (KOHL et al., 2018).

Os dados do cgMLST por meio do WGS forneceram uma resolução adicional ao diagnóstico da tuberculose bovina, distinguindo isolados de um mesmo rebanho e sua dispersão entre os municípios. Na pesquisa atual, foi demonstrado que o conhecimento da epidemiologia combinado com dados do WGS pode fornecer um meio para investigações aprofundadas da dinâmica da bTB, destacando aspectos importantes e ainda não quantificados, como a extensão da transmissão entre espécies e a taxa de substituição. O custo decrescente, resolução adicional, e boa evidência com a localização espacial justificam o uso do WGS como ferramenta na vigilância da tuberculose bovina no Estado de Santa Catarina.

5 CONCLUSÕES

- 1) A análise baseada no cgMLST forneceu o rastreamento rápido, de alta resolução das estirpes clínicas de *M. bovis* necessárias para a vigilância local e global da tuberculose bovina.
- 2) Os resultados do WGS corroboraram evidências investigativas de eventos de transmissão de rebanho para rebanho do *M. bovis*.
- 3) O WGS demonstrou ser uma ferramenta considerável para a erradicação e controle da bTB, melhorando consideravelmente o poder discriminatório dos dados de tipagem molecular
- 4) O isolamento, seguido da identificação e utilização do WGS constituem fontes de relevantes informações que poderão ser adotadas como instrumento de vigilância pelo Estado de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

ABASCAL, E. et al. Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: rapid tools for cross-border surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 24, n. 4, jan. 2019.

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, abr. 2018.

ARMAS, F. et al. Comparison of semi-automated commercial rep-PCR fingerprinting, spoligotyping, 12-locus MIRU-VNTR typing and single nucleotide polymorphism analysis of the embB gene as molecular typing tools for Mycobacterium bovis. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 8, p. 1151–1157, 4 ago. 2017.

Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

BAHIENSE, L. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3549, 9 nov. 2016.

BARBIERI, J. de M. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the State of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3531–3548, 12 ago. 2016.

BIEK, R. et al. Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of Mycobacterium bovis in sympatric cattle and badger populations. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 11, p. e1003008, 2012.

BRITES, D. et al. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted Mycobacterium tuberculosis Complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2820, 27 nov. 2018.

BRUNING-FANN, C. S. et al. Use of whole-genome sequencing and evaluation of the apparent sensitivity and specificity of antemortem tuberculosis tests in the investigation of an unusual outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a Michigan dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 2, p. 206–216, 15 jul. 2017.

BYRNE, A. W. et al. Bovine tuberculosis visible lesions in cattle culled during herd breakdowns: the effects of individual characteristics, trade movement and co-infection. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 400, 29 dez. 2017.

CARVALHO, R. C. T. et al. Molecular Typing of Mycobacterium bovis from Cattle Reared in Midwest Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162459, 15 set. 2016.

CODY, A. J. et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Stable,

Comparative Analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Human Disease Isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2086–2097, jul. 2017.

COMAS, I. Genomic Epidemiology of Tuberculosis. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. 1019p. 79–93.

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 127–134, 1 out. 1988.

CRISPELL, J. et al. Using whole genome sequencing to investigate transmission in a multi-host system: bovine tuberculosis in New Zealand. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 180, 16 dez. 2017.

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. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3385, 9 nov. 2016.

FITZGERALD, S. D.; KANEENE, J. B. Wildlife Reservoirs of Bovine Tuberculosis Worldwide: Hosts, Pathology, Surveillance, and Control. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 3, p. 488–499, 20 maio 2013.

GALVIS, J. O. A. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3567, 9 nov. 2016.

GHANEM, M. et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing: a Standardized Approach for Molecular Typing of *Mycoplasma gallisepticum*. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 1, 25 out. 2018.

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, p. 310–315, 1 maio 2018.

GHEBREMARIAM, M. K. et al. Genetic profiling of *Mycobacterium bovis* strains from slaughtered cattle in Eritrea. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006406, 17 abr. 2018.

GORMLEY, E.; CORNER, L. A. L. Wild Animal Tuberculosis: Stakeholder Value Systems and Management of Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 327, 21 dez. 2018.

GUEDES, I. B. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3579, 9 nov. 2016.

HAUER, A. et al. MIRU-VNTR allelic variability depends on *Mycobacterium bovis* clonal group identity. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 45, p. 165–169, nov. 2016.

HIGGINS, P. G. et al. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179228, 8 jun. 2017.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. **Future Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 623–630, 24 maio 2014.

JONES, R. C. et al. Phylogenetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Wales using core genome MLST to analyse whole genome sequencing data. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM.02025-18, 3 abr. 2019.

KIMURA, B. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? **Food Microbiology**, v. 75, p. 28–36, 1 out. 2018.

KOHL, T. A. et al. Whole-Genome-Based *Mycobacterium tuberculosis* Surveillance: a Standardized, Portable, and Expandable Approach. 2014.

KOHL, T. A. et al. Harmonized Genome Wide Typing of Tubercle Bacilli Using a Web-Based Gene-By-Gene Nomenclature System-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). 2018a.

KOHL, T. A. et al. Harmonized Genome Wide Typing of Tubercle Bacilli Using a Web-Based Gene-By-Gene Nomenclature System. **EBioMedicine**, v. 34, p. 131–138, ago. 2018b.

KOHL, T. A. et al. *Mycobacterium bovis* Persistence in Two Different Captive Wild Animal Populations in Germany: a Longitudinal Molecular Epidemiological Study Revealing Pathogen Transmission by Whole-Genome Sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 9, 27 set. 2018c.

LASSERRE, M. et al. Whole genome sequencing of the monomorphic pathogen *Mycobacterium bovis* reveals local differentiation of cattle clinical isolates. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 2, 2 dez. 2018.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, n. 5, p. 589–595, 2010.

LIMA, P. R. B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the State of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3601, 9 nov. 2016.

MAIDEN, M. C. J. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728–36, 2013.

MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/controle-e-erradicacao-da-brucelose-e-tuberculose-pncebt>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to

global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1901–6, 13 fev. 2001.

MEEHAN, C. J. et al. The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. **EBioMedicine**, v. 37, p. 410–416, nov. 2018.

MERKER, M. et al. The Evolution of Strain Typing in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 43–78.

NÉSPOLI, J. M. B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3589, 9 nov. 2016.

NEUMANN, B. et al. A Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 3, 16 mar. 2019.

O'TOOLE, R. F. Development of a New Genome-Wide MLST Scheme for High-Resolution Typing of Diverse *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. **EBioMedicine**, v. 34, p. 6–7, ago. 2018.

OLEA-POPELKA, F. et al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* —a call for action. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. e21–e25, jan. 2017.

ORLOSKI, K. et al. Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium bovis* Isolated From Livestock in the United States, 1989–2018. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 253, 30 out. 2018.

PALMER, M. V. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of Wildlife Reservoir Hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 1–13, nov. 2013.

PARK, K.-H. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and spa typing. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179003, 2 jun. 2017.

PATÍÑO, L. H. et al. Unveiling the Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes and Core Genome Phylogenies for Genotyping *Chlamydia trachomatis*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1854, 22 ago. 2018.

POZO, P. et al. Analysis of the cattle movement network and its association with the risk of bovine tuberculosis at the farm level in Castilla y León, Spain. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 1, p. 327–340, 1 jan. 2019.

PRICE-CARTER, M. et al. Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. **Frontiers in microbiology**, v.5, 30 out. 2018.

QUEIROZ, M. R. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3647, 9 nov. 2016.

RIBEIRO, L. A. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3561, 9 nov. 2016.

ROCHA, W. V. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3625, 9 nov. 2016.

SALVADOR, L. C. M. et al. Disease management at the wildlife-livestock interface: using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA. **Molecular Ecology**, 26 fev. 2019a.

SALVADOR, L. C. M. et al. Disease management at the wildlife-livestock interface: using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA. **Molecular Ecology**, 26 fev. 2019b.

SANDOVAL-AZUARA, S. E. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 48–56, 1 out. 2017.

SANKARASUBRAMANIAN, J. et al. Development and evaluation of a core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme for *Brucella* spp. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 67, p. 38–43, jan. 2019.

SCHÜRCH, A. C. et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 350–354, abr. 2018.

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. 5Supl2, p. 3611, 9 nov. 2016.

SMITH, N. H. et al. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature Review Microbiology**. 2006 Sep;4(9):670-81

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A. Tuberculosis in animals and humans. In: **Zoonotic Tuberculosis**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc, 2014. p. 3–7.

TREWBY, H. et al. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. **Epidemics**, v. 14, p. 26–35, mar. 2016.

VELOSO, F. P. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3659, 9 nov. 2016.

VENDRAME, F. B. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3639, 9 nov.

2016.

WALKER, T. M. et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 137–46, fev. 2013a.

WALKER, T. M. et al. Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 9, p. 796–802, set. 2013b.

WALKER, T. M. et al. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK, 2007–12, with whole pathogen genome sequences: an observational study Europe PMC Funders Group. **Lancet Respir Med**, v. 2, n. 4, p. 285–292, 2014.

WALKER, T. M. et al. A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 431–440, 2018.

WARREN, R. M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818–22, jul. 2006.

WILLIAM BYRNE, A. et al. Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. **Article**, v. 5, p. 272, 30 out. 2018.

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. 269–73, maio 1992.

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, p. 2389, 2017.