UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA MIRU-VNTR DE *Mycobacterium bovis* ISOLADOS DE TECIDO BOVINO

Antonio Francisco de Souza Filho

CAMPO GRANDE, MS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA MIRU-VNTR DE *Mycobacterium bovis* ISOLADOS DE TECIDO BOVINO

MIRU-VNTR GENOTYPING OF *Mycobacterium bovis* ISOLATED FROM BOVINE TISSUE

Antonio Francisco de Souza Filho

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal
Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS
2013

ANTONIO FRANCISCO DE SOUZA FILHO

"GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA MIRU-VNTR DE *Mycobacterium bovis* ISOLADOS DE TECIDO BOVINO"

"MIRU-VNTR GENOTYPING OF *Mycobacterium bovis* ISOLATED FROM BOVINE TISSUE"

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADO: 23/03/2013

Ana Luiza Alves Rosa Osório
Orientadora

Dr. Flábio Ribeiro de Araújo

Dr. Adolfo Carlos Barreto Santos

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e compreensão.

A professora Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório pela orientação deste trabalho.

A professora Dra. Cássia Rejane Brito Leal pelo apoio e amizade.

A técnica Lúcia Terezinha Restel Silva pelos conselhos e ensinamentos.

A equipe do laboratório de Micobacteriologia da FAMEZ/UFMS: Professora Dra. Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge, doutoranda Letícia Alves Gomes Albertti e mestranda Daniela de Oliveira Cazola.

A equipe da Embrapa Gado de Corte: doutoranda Cristina Pires Aráujo, Dr. Flábio Ribeiro de Aráujo e o Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos.

Aos Professores Dr. Antonio Ruffino Neto, Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira e Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior.

A Dra. Eunice Atsuko Totumi Cunha, do Laboratório Central de Saúde Publica (LACEN MS), por todo apoio.

As estagiárias: Franciele da Silva Oliveira, Daniele Louise Cesquim, Resenângela da Costa Lunas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS e seus docentes.

Aos amigos Nathália Albuquerque, Carina Bastos, Rani Baleroni e Guilherme Rodovalho.

As mestrandas Ariany Carvalho, Larissa Bezerra, Neylisa Lazaro e Nickolly Kawski.

A Capes, CNPq, Fundect e ICHORTA pelo apoio financeiro.

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

Resumo

SOUZA-FILHO, A. F. Genotipagem pela técnica MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* isolados de tecido bovino. 2013. 73 f. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Mycobacterium bovis, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é o agente mais comum da tuberculose bovina. Além dos bovinos pode acometer outros animais domésticos, animais silvestres e o homem. Enfermidade endêmica no Brasil, cujo controle se tornou alvo de exigências sanitárias internacionais. Avanços nas técnicas de tipagem molecular têm contribuído para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina, por meio da identificação e caracterização de isolados de *M. bovis*. Os dados de tipagem molecular permitem discernir os genótipos de *M. bovis* que são predominantes em uma área específica e como os focos múltiplos ocorrem. Oferecem dados para rastrear a origem dos surtos e assim bloquear a transmissão da tuberculose bovina. A técnica MIRU-VNTR é uma poderosa ferramenta para a identificação e genotipagem do complexo *M. tuberculosis*, inclusive *M. bovis*, especialmente quando 24 loci são analisados. O objetivo do presente estudo foi estudar a diversidade genética de isolados de *M. bovis* presentes em rebanhos bovinos do Brasil. No primeiro estudo 55 isolados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), obtidos a partir do cultivo de tecidos colhidos durante o abate de bovinos provenientes de 19 propriedades de quatro estados brasileiros, foram genotipados por meio da técnica MIRU-VNTR com 24 iniciadores. Vinte e dois perfis genéticos foram observados, sendo 13 perfis com mais de uma cepa (agrupamentos) e nove isolados de perfil único. Dos 24 loci estudados, em 11 não houve qualquer diversidade alélica e a maioria que apresentou diversidade alélica está nos loci ETR e VNTR. O segundo estudo teve como objetivo identificar os agrupamentos genéticos de isolados de *M. bovis* obtidos em um foco de tuberculose bovina no Rio Grande do Sul (RS). A genotipagem de 18 isolados de BAAR revelou três perfis genéticos distintos: o primeiro com 15 isolados, o segundo com dois isolados e um isolado de perfil único. Os iniciadores responsáveis por essa distinção foram o MIRU 31, que agrupou dois isolados em um perfil, e ETR A, B e C que discriminou o isolado de perfil único. Agrupamentos de isolados são indicativos de transmissão recente e isolados de perfil único sugerem reativação de infecção latente. No estudo limitado ao foco de tuberculose bovina no RS demonstra-se que há diversidade genética entre as cepas em circulação, embora exista um agrupamento predominante. A técnica MIRU-VNTR com 24 iniciadores permite a identificação da diversidade genética de *M. bovis* em diferentes áreas geográficas do Brasil, representada por superinfecção, assim como pelo encontro do mesmo perfil de *M. bovis* em diferentes localidades, consequente a movimentação indiscriminada de animais doentes.

Palavras-chave: MIRU-VNTR, diversidade genética, tuberculose bovina, agrupamentos genéticos, *Mycobacterium bovis*, genotipagem.

Abstract

SOUZA-FILHO, A. F. MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium bovis* isolated from bovine tissue. 2013. 73 f. Dissertation - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Mycobacterium bovis, a member of *Mycobacterium tuberculosis* complex, is the most common agent of bovine tuberculosis. Besides the cattle, it can affect other domestic animals, wild animals and man. Endemic disease in Brazil, which control has become the target of international sanitary requirements. Advances in molecular typing techniques have contributed to the epidemiological study of bovine tuberculosis, through the identification and characterization of *M. bovis* isolates. Molecular typing data allow discern genotypes of *M. bovis* which are predominant in a specific area and how multiple foci occur. Provides data to trace the source of outbreaks and so block the transmission of bovine tuberculosis. The MIRU-VNTR technique is a powerful tool for identification and genotyping of the *M. tuberculosis* complex, including *M. bovis*, especially when 24 loci are analyzed. The aim of this study was to study the genetic diversity of *M. bovis* isolates present in cattle in Brazil. In the first study, 55 acid-fast bacilli isolates (AFB), obtained from the cultivation of tissues removed during slaughter cattle from 19 properties in four Brazilian states, were genotyped by MIRU-VNTR technique with 24 primers. Twenty-two genetic profiles were observed, with 13 profiles with more than one strain (clusters) and nine unique profile isolates. From 24 loci studied, 11 showed no allelic diversity and most showed allelic diversity in the VNTR and ETR loci. The second study aimed to identify the gene clusters of *M. bovis* isolates obtained from an outbreak of bovine tuberculosis in Rio Grande do Sul (RS). Genotyping of 18 AFB isolates revealed three distinct genetic profiles: the first with 15 isolates, the second with two isolates and one isolate of unique profile. The primers responsible for this distinction were MIRU 31, that grouped two isolates in a profile, and ETR A, B and C which allowed discrimination of an unique profile isolate. Isolates clusters are indicative of recent transmission and unique profile isolates suggest reactivation of latent infection. The study limited to the focus of bovine tuberculosis in RS shows that there is genetic diversity among the strains in circulation, although there is a predominant grouping. The MIRU-VNTR technique with 24 primers allows identification of genetic diversity of *M. bovis* in different geographical areas of Brazil, represented by multiple infection as well as by meeting of the same profile of *M. bovis* in different locations, resulting in indiscriminate movement of diseased animals.

Keywords: MIRU-VNTR, genetic diversity, bovine tuberculosis, gene clusters, *Mycobacterium bovis*, genotyping.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **9**

2 REVISÃO DE LITERATURA **13**

2.1 Filogenia de *M. bovis* **13**

2.2 Complexos clonais **15**

2.3 Genoma de *M. bovis* **18**

2.4 Epidemiologia molecular **19**

2.4.1 RFLP-IS*6110* **20**

2.4.2 *Spoligotyping* **21**

2.4.3 MIRU-VNTR **22**

2.4.4 MST/MLST/MLSA **25**

2.4.5 SNP **25**

2.4.6 WGS **26**

3 OBJETIVOS **28**

REFERÊNCIAS **29**

ARTIGO 1 ..... **39**

Discriminação genética por meio de 24 loci MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* de diferentes regiões do Brasil **40**

ARTIGO 2 ..... **56**

Perfis Genéticos de *Mycobacterium bovis* Isolados em Único Rebanho Bovino **57**

1 INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis, agente da tuberculose bovina, pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero Mycobacterium e faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que é composto por oito espécies estreitamente relacionadas, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. mungi* (CORNER; GORMLEY, 2012) que apresentam grandes semelhanças genéticas.

Mycobacterium 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. Essas 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).

Além dos bovinos, *M. bovis* pode acometer outros animais domésticos, animais silvestres e humanos caracterizando assim, a tuberculose bovina como uma zoonose e um problema de saúde pública (ACHA; SZYFRES, 2001; OIE, 2009; THOEN et al., 2009).

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, mas a sua 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). No Brasil, os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicaram prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006). Estudos mais recentes envolvendo amostras planejadas, sendo diagnosticados de acordo com os critérios sanitários preconizados pelo Programa Nacional de Controle e erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal, revelaram no estado da Paraíba, no período de janeiro de 2008 a julho de 2009, 62 (0,57%) rebanhos com pelo menos um animal positivo ao teste de tuberculinização. Em relação aos animais, 54.472 bovinos foram testados para o diagnóstico da tuberculose, dos quais 136 (0,25%) foram positivos (FIGUEIREDO et al., 2010). No estado do Espírito Santo foram examinados 32.052 bovinos oriundos de 1.933 rebanhos de vários municípios. Destes, 163 (0,51%) animais apresentaram reação positiva para tuberculose (LAVAGNOLI et al., 2010). No Mato Grosso, Néspoli (2012) estimou a prevalência de 1,3% em rebanhos e 0,123% de animais positivos para tuberculose.

A existência de rebanhos com tuberculose tem impacto negativo sobre a produtividade. Segundo Homem (2003), os principais prejuízos da doença são redução da

produção de leite, diminuição da conversão alimentar, redução de nascimentos e mortalidade perinatal de bezerros. Existe ainda a perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (BRASIL, 2006). No Brasil e em outros países da América Latina, onde a febre aftosa está em fase avançada de erradicação, o controle da tuberculose já é alvo de exigências sanitárias internacionais (BRASIL, 2012; LOBO, 2008). Diante disso é necessário incentivar as estratégias que visem tornar os estabelecimentos de criação certificados livres da tuberculose, impedindo assim possíveis prejuízos à nação, provenientes de sanções internacionais (VALENTE; VALE; BRAGA, 2011).

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa transmitida principalmente pela via respiratória, quando o animal inala aerossóis contaminados com o bacilo eliminado por outro animal, porém a transmissão depende da geração de aerossóis, da quantidade de bacilos excretados e densidade do rebanho (POLLOCK et al., 2006). Além da eliminação por aerossóis, o animal pode disseminar o agente por descarga nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas, e pelo sêmen (POLLOCK; NEILL, 2002). O trato digestivo também é porta de entrada da tuberculose bovina, principalmente em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa e em animais que ingerem água ou forragens contaminadas (BRASIL, 2006).

Cerca de 90% dos casos de tuberculose bovina ocorre pela inalação de aerossóis contaminados com *M. bovis* (ROXO, 1997). Ao atingir o alvéolo o bacilo é fagocitado por macrófagos e células dendríticas, que por quimiotaxia migram até o foco da infecção. Se os bacilos resistirem aos efeitos bactericidas dos fagócitos ocorrerá multiplicação dos mesmos até 2 a 3 semanas após a inalação do agente infeccioso. Na tentativa de conter o crescimento intracelular das micobactérias o hospedeiro destrói seus próprios tecidos por necrose de caseificação, resultante da reação de hipersensibilidade tardia desencadeada pela ativação dos macrófagos por interferon-gama (IFN-γ) e interleucina-2 (IL-2), citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares (Th1) aproximadamente dez dias após o início da infecção. Novas células de defesa migram para o local dando origem a uma lesão granulomatosa específica (BRASIL, 2006; FLYNN; CHAN, 2001; STRAIN; McNAIR; McDOWELL, 2011).

Nos bovinos, o curso da infecção é crônico e a evidência clínica da tuberculose raramente é encontrada, mesmo em casos avançados, quando muitos órgãos podem estar envolvidos. Quando presentes, os sinais clínicos variam. Os linfonodos apresentam-se aumentados de volume, podendo obstruir as vias aéreas, o trato digestivo, ou vasos sanguíneos. O envolvimento do trato digestivo algumas vezes se manifesta por diarreia intermitente intercalada por períodos de constipação. Magreza extrema e desconforto

respiratório agudo podem ocorrer durante a fase terminal da tuberculose (OIE, 2009). Dificuldade em ganhar ou manter peso e queda na produção de leite também são relatados (OLMSTEAD; RHODE, 2004).

O teste padrão para a detecção da tuberculose bovina ante-mortem é a tuberculinização, cujos procedimentos para sua realização no Brasil, bem como sua interpretação, estão definidos no regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2006). Há bovinos que, embora infectados, não reagem à tuberculinização devido a supressão do sistema imunitário (OIE, 2009; RHODES, 2005).

As lesões sugestivas da doença são frequentemente encontradas nos pulmões e em linfonodos retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos e são visualizadas durante a necropsia ou durante a inspeção de carcaças em matadouros frigoríficos. Caracterizam-se por nódulos de diâmetro variável entre 1,0 a 3,0 cm ou mais, podendo ser confluentes, aspecto purulento ou caseosos, de cor branca, cinza ou amarelados, de consistência firme e inodoros (BRASIL, 2006; OIE, 2009). A partir dessas lesões é realizado o isolamento micobacteriano em meio de cultura Stonebrink. O modelo característico de crescimento, a morfologia colonial em meios de cultura e a presença de BAAR podem formular o diagnóstico preliminar da infecção por *M. bovis*. Tais colônias podem ser identificadas por meio de provas bioquímicas ou por técnicas de biologia molecular (OIE, 2009).

As diferenças bioquímicas entre espécies de micobactérias podem ser utilizadas para confirmar o agente causal da doença. Essas provas bioquímicas apresentam alta especificidade, porém são trabalhosas, requerem culturas novas, puras e abundantes, condições só alcançadas após sucessivos repiques a partir do primo isolamento, que pode se estender por vários meses até a confirmação da espécie (MICHEL; MULLER; van HELDEN, 2010). Testes bioquímicos são úteis na diferenciação de bactérias do complexo *M. tuberculosis*, mas técnicas moleculares são largamente utilizadas em laboratórios de referência em todo o mundo (HARRIS, 2006; THOEN et al., 2009).

As técnicas de tipagem molecular ajudam a estratificar e refinar dados, fornecendo informações mais sensíveis e específicas, que facilitam as atividades epidemiológicas, incluindo a vigilância de doenças, investigações de surtos, identificando padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente díspares (FOXMAN; RILEY, 2001), bem como pode revelar a presença de focos provocados por mais de uma cepa (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997). Tipagem molecular de isolados tornou-se uma ferramenta valiosa no estudo epidemiológico de *M. bovis*, permitindo aos investigadores identificar

fontes de infecção e alcançar conhecimento mais amplo sobre a transmissão da tuberculose. Além disso, em combinação com dados espaciais, destaca a distribuição geográfica das cepas de *M. bovis* em estudo e promove o estudo da genética de populações (BONIOTTI et al., 2009).

Genotipagem por meio de análise do número variável de repetições em sequência (VNTR – *Variable Number Tandem Repeat*) e de elementos genéticos chamados Unidades Repetitivas Micobacterianas (MIRU) surgiram como marcadores valiosos para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis* (ALLIX et al., 2006). Estudos populacionais mostraram que a tipagem MIRU-VNTR tem sido mais eficiente que o RFLP-*IS6110*, no estudo da transmissão da tuberculose em ambientes com características epidemiológicas representativas de muitos países desenvolvidos. Em comparação com *spoligotyping*, tipagem MIRU-VNTR tem a vantagem de ser uma técnica multilocus, o que aumenta a possibilidade de detectar variações (diferenças) no genoma das cepas (COLLINS, 2011).

Muitos loci possuem hipervariabilidade em seus números de repetições (NAKAMURA et al., 1988). Para o complexo *M. tuberculosis* mais de 40 loci MIRU-VNTR foram investigados (Le FLÈCHE et al., 2002). Quase metade destes mostra pouca ou nenhuma diferença entre grandes coleções de isolados. O MIRU-VNTR restantes apresentam diferentes graus de discriminação e dependem da coleção de isolados em análise e dos loci MIRU-VNTR utilizados (ALLIX et al., 2006; BONIOTTI et al., 2009; RORING et al., 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filogenia de *M. bovis*

Os primeiros estudos filogenéticos de micobactérias foram realizados com base em similaridades fenotípicas (BERGEY et al., 1923 apud TORTOLI, 2012). 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). Inicialmente marcadores fenotípicos como a susceptibilidade micobacteriana ao fago (fagotipagem) e o padrão de resistência a drogas (antibiogramas) eram usados para distinguir cepas (RODRÍGUEZ–CAMPOS, 2012).

Em 1963, Schuitemaker desenvolveu uma maneira de diferenciar isolados de *M. tuberculosis* pela exposição a uma seleção predefinida de vírus que podem lisar bactérias (bacteriófagos) (SCHUITEMAKER, 1968 apud SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 2012). Dependendo da imunidade intrínseca, as cepas de *M. tuberculosis* sobrevivem à infecção por alguns bacteriófagos, mas não por outros. Fagotipagem tem um baixo poder discriminatório, no entanto, revelou-se útil para diferenciar cepas de surtos específicos de *M. tuberculosis* (SNIDER; JONES; GOOD, 1984) e na detecção de contaminação cruzada em laboratório (JONES, 1988).

Outro método para a diferenciação fenotípica de cepas foi perfis de susceptibilidade a droga anti-TB, em combinação com outras características bioquímicas que permitiram subdivisão limitada de isolados de *M. tuberculosis* (COLLINS; YATES; GRANGE, 1982). Esta técnica nunca foi amplamente utilizada para fins de tipificação, porque muitos isolados tem o mesmo perfil de resistência e também por ser uma característica não estável (SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 2012).

Um salto qualitativo ocorreu a partir da década de 1960, 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). Na década de 1980, sob a influência dos avanços na biologia molecular, os métodos de tipagem baseados no DNA foram desenvolvidos com melhor poder discriminatório em relação aos métodos fenotípicos. No entanto, um elevado poder de discriminação não é a única característica de um sistema de tipagem ideal. Os procedimentos

devem ser adequados para permitir uma padronização e alta reprodutibilidade inter e intra-laboratório e rápida execução. Além disso, a genética do marcador deve ter o mesmo ritmo de transformação que o ciclo de transmissão, de modo que as fontes primárias, secundárias e terciárias de infecção possam ser distinguidas se os marcadores mudarem um pouco após cada transmissão. Fontes de infecção podem ser determinadas e as cadeias de transmissão na comunidade rastreadas (BOER et al., 1999). Por último, mas não menos importante, os custos de um sistema de tipagem devem ser tão baixos que a aplicação seja possível a todos os isolados clínicos em um dado contexto (SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 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 da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998) 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).

Estudos de genômica comparativa entre uma estirpe de *M. tuberculosis* e outra de *M. bovis* identificaram mais de 140 genes cuja presença é facultativa e que estão relacionados com diferenças ao nível do fenótipo, hospedeiro preferencial e virulência. Muitos desses genes ocorrem em regiões de diferenciação (RD) que foram eliminadas em determinadas espécies (PYM et al., 2002).

Foi com base no estudo de deleções sucessivas de determinadas RD, que Brosch et al. (2002) traçaram um novo cenário evolutivo para o MTBC. Segundo esses autores o ancestral comum ao *M. bovis* e ao *M. caprae* teria perdido ao longo da evolução as regiões RD9, numa fase seguinte RD7, RD8 e RD10 e por fim RD12 e RD13. Ao contrário das cepas de amostras clínicas, as cepas vacinais de *M. bovis* BCG apresentam a deleção da RD1, sugerindo um papel importante desta região na virulência das cepas patogênicas do complexo (PYM et al., 2002).

Baseado em 24 loci de MIRU-VNTR, Wirth et al. 2008 propuseram que o MTBC é composto de duas linhagens principais, sendo a linhagem 1 composta exclusivamente de isolados *M. tuberculosis stricto sensu* (todos de pacientes humanos) exceto o grupo do Leste Africano-Indiana (EAI) e a linhagem 2 composta principalmente de isolados de animais (*M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinipedii*) e isolados do Leste Africano (*M. africanum* West African 1 e 2) (WIRTH et al., 2008). Essas duas linhagens são clones do progenitor *M.*

prototuberculosis que emergiu aproximadamente 40.000 anos atrás. Esse progenitor acompanhou a migração dos humanos modernos para fora da África e sofreu alterações que levaram a sua diferenciação. Acredita-se que as duas principais linhagens surgiram mais tarde cerca de 20.000 a 30.000 anos. A linhagem de *M. tuberculosis* (linhagem 1) se espalhou exclusivamente entre os seres humanos, com ondas subsequentes de migração para Ásia, Europa e África continental. A linhagem 2 surgiu a partir da população *M. tuberculosis* EAI e é a provável fonte de tuberculose animal (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003). Assim, é provável que os seres humanos infectaram seus animais e não o contrário. A transição de humanos para os hospedeiros animais pode, assim, estar ligada à domesticação de animais, que ocorreu cerca de 13.000 anos atrás. A contaminação dos animais pode ter sido causada por uma epidemia de tuberculose em humanos que devido as altas taxas de infecção levaram a propagação da bactéria para hospedeiros animais levando a transição para novos nichos (WIRTH, MEYER, ACHTMAN, 2005; WIRTH et al., 2008).

2.2 Complexos clonais

Ao fim do sequenciamento de algumas cepas do complexo foi possível verificar que os membros do MTBC apresentam mais de 99,9% de semelhança no DNA e sequências idênticas no gene de 16S rRNA. Além disso, não há evidência de transferência horizontal de genes entre os membros do MTBC. Os membros do MTBC têm a evolução clonal, evidenciando deleções de sequências nucleotídicas extensas (LSPs – *Large Sequence Polymorphisms*) e eliminações/mutações pontuais numa só base nucleotídica (SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*), que permitem distinguir diferentes estirpes e inferir relações filogenéticas (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2005).

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 desse ancestral (SMITH, 2012). Para bactérias que não apresentam a sua diversidade limitada pela reprodução sexuada, a diversidade genética pode ser decorrente de eventos como a recombinação genética, translocações, duplicações ou inversões no DNA. Foi observado que nos membros do MTBC não há troca de material genético entre linhagens (SMITH et al., 2011; SALES, 2012). As baixas taxas de homoplasia (quando duas linhagens desenvolvem independentemente a mesma característica) 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; GAGNEUX, 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; SALES, 2012).

Embora a tuberculose bovina tenha sido relatada em todos os continentes onde há criação de bovinos, é consenso que este patógeno se originou em um lugar, de uma só vez, e desde então tem sido distribuído em todo o mundo (SMITH et al., 2011). Alguns complexos clonais de *M. bovis* foram definidos pela presença de deleções específicas. Dois complexos estão geograficamente localizados na África, o complexo clonal África1 (Af1) é dominante em Camarões, Nigéria, Mali e Chade e foram identificados pela deleção cromossômica específica (RDAf1) e pela ausência do espaçador 30 no *spoligotyping*. Em outros países da África como Argélia, Burundi, Etiópia, Madagascar, Moçambique, África do Sul, Tanzânia e Uganda assim como na Europa, Irã e América do Sul, essa deleção não foi encontrada sugerindo que o Af1 está geograficamente localizado (MUELLER et al., 2009). Já o complexo clonal África2 (Af2) foi definido pela deleção cromossômica RDAf2 e pela associação com a ausência dos espaçadores 3-7 no padrão de *spoligotyping*. O Af2 foi observado com alta frequência em isolados de *M. bovis* em Uganda, Burundi, Tanzânia e Etiópia. Em países africanos como Argélia, Mali, Chade, Camarões, África do Sul e Moçambique a deleção cromossômica RDAf2 não foi encontrada, o que sugere que este complexo clonal está localizado na África Oriental. A ausência dos espaçadores 3-7 foi raramente observada entre os isolados fora da África e os poucos isolados detectados apresentaram a RDAf2 intacta. Um dado interessante observado foi que os membros do Af2

de *M. bovis* apresentaram quatro ou mais cópias da IS*6110*, em contraste com outras cepas de *M. bovis* que possuem apenas uma ou poucas cópias. A deleção RDAf2 se mostrou intacta nas cepas do complexo clonal Af1, assim como a deleção RDAf1 se mostrou intacta para as linhagens Af2, permitindo concluir que as cepas dos complexos clonais Af1 e Af2 são mutuamente exclusivas e não compartilham qualquer história filogenética com o ancestral comum mais recente de cada complexo clonal, sugerindo que a mistura entre as populações de bovinos nesses países é pouco frequente (BERG et al., 2011)

O terceiro complexo clonal, identificado por Smith et al. (2011), apresenta distribuição global e é nomeado Europa 1 (Eu1). Esse complexo é marcado pela exclusão da região cromossômica RDEu1. Cepas do complexo clonal Eu1 podem ser identificadas pela perda de espaçador 11 no padrão *spoligotyping*, embora esta característica não é necessariamente específica para este complexo clonal. Dados mostram que cepas desse complexo são altamente observadas em isolados da República da Irlanda, Reino Unido, Estados Unidos, África do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Canadá, Argentina, Chile, Equador, México, Coréia e do Cazaquistão. E foi pouco observado no Brasil, Franca, Espanha, Portugal, Irã e em uma pequena parte das cepas de Taiwan além de ser raro em outros países da comunidade europeia. A explicação mais simples para a distribuição desse complexo clonal é que ele foi disseminado por bovinos infectados do Reino Unido a bovinos de antigos parceiros comerciais (SMITH et al., 2011).

Um quarto complexo clonal Europa 2 (Eu2) também foi identificado. Ao contrário dos outros já mencionados, este complexo foi definido pela ausência do espaçador 21 associado a um SNP no gene *guaA*. Os isolados de *M. bovis* membros do Eu2 são provenientes da Península Ibérica onde são encontrados com alta frequência, enquanto na França, Itália e Ilhas Britânicas eles existem, mas em uma frequência muito baixa. A mutação no gene *guaA* não foi observada nas cepas de referência dos três complexos clonais descritos anteriormente (Af1, Af2 e Eu1), sugerindo que o Eu2 identifica um quarto complexo clonal de importância global (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

A genotipagem de *M. bovis* na Grã-Bretanha mostrou que a população é constituída por um pequeno número de clones facilmente identificáveis e que estes clones estão geograficamente localizados. Nestas subdivisões geográficas, um único clone é dominante ou atingiu fixação (clone endêmico). Uma análise do polimorfismo VNTR nos dois espoligotipos mais comuns concluiu que a estrutura da população era incompatível com um processo de mutação aleatória, e pode ser descrita como uma série de expansões clonais em que certos genótipos expandiram para uma alta frequência, quer como um resultado da amostragem

populacional como clones que invadiram novos nichos geográficos (efeito fundador) ou pela seleção (SMITH et al., 2006).

Em síntese, o MTBC é um grupo de cepas altamente clonal (SMITH et al., 2006) e a diversidade genética entre os seus membros pode em parte ser causada por exclusões que deverão representar eventos genéticos (GORDON et al., 1999). Análises dos complexos clonais de *M. bovis* representam atualmente, uma nova ferramenta para a interpretação e exploração em massa de dados gerados constantemente na rotina de epidemiologistas moleculares, e ainda, permite criar hipóteses para investigar a distribuição geográfica e a patogenicidade deste patógeno de importância global (SMITH et al., 2006).

2.3 Genoma de *M. bovis*

O sequenciamento genômico demonstrou que o genoma de *M. bovis* possui 4.345.492 pares de bases (pb) no isolado virulento de bovino AF2122/97 e é menor que o genoma de *M. tuberculosis* (4.411.532 pb para o isolado humano H37Rv), com similaridade de 99,95% e elevado teor de guanina e citosina — GC (~ 65%) mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. Apesar da similaridade genética com *M. tuberculosis*, o genoma de *M. bovis* tem sido reduzido devido a deleções, eventos considerados unidirecionais nessas bactérias (GARNIER et al., 2003). Assim, as deleções no DNA de *M. bovis* são os principais responsáveis pela diferenciação e afetam genes envolvidos no transporte, nas estruturas de superfície celular e no metabolismo intermediário. Estas deleções podem remover genes que são dispensáveis para a adaptação de hospedeiros e conduzir para uma gama de hospedeiros diferentes. Mutações pontuais, também desempenham papel na definição do fenótipo, como é o caso da resistência a pirazimamida de *M. bovis*. Outra alteração notável é a mutação do gene da piruvato quinase que torna *M. bovis* incapaz de utilizar glicerol como fonte de carbono (KEATING et al., 2005).

A análise no genoma de *M. bovis* contestou a hipótese epidemiológica de que *M. tuberculosis* era uma adaptação humana de *M. bovis* de bovinos. A perda irreversível de material no DNA descoberto pelo sequenciamento do genoma de *M. bovis* e a análise sistemática dos polimorfismos em um grande painel de estirpes levou ao novo paradigma que *M. canettii* é provavelmente a espécie ancestral do complexo *M. tuberculosis*. Sucessivas deleções no DNA, começando pela perda de região RD9, levaram a diferenciação de *M. africanum*, *M. bovis* e *M. microti*. Além disso, *M. bovis* BCG sofreu exclusões adicionais durante adaptação *in vitro* com perda da região RD1 (OLSEN; BARLETTA; THOEN, 2010).

2.4 Epidemiologia molecular

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 baseadas em todo o genoma e técnicas que se baseiam em sequências do genoma (DURR; HEWINSON; CLIFTON-HADLEY, 2000). Técnicas envolvendo 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 sequências no genoma. As técnicas de sequências no 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* é o *Restriction Fragment Lenght Polymorfism* — RFLP-IS*6110*, *Spoligotyping* e M*ycobacterial Interspersed Repetitive Units* — MIRU; *Variable Number Tandem Repeats* — VNTR (COLLINS, 2011; DUARTE et al., 2007; HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004).

O RFLP-IS*6110* é considerado método padrão-ouro para a diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*, mas proporciona uma limitada discriminação entre isolados *M. bovis*, já que a maioria dos isolados abriga apenas uma ou poucas cópias desse elemento. Tipagem baseada no *spoligotyping* tem sido amplamente utilizada para diferenciação de *M. bovis*, é altamente reprodutível e rápida, e representa o primeiro sistema de tipificação, universalmente reconhecido, para populações de *M. bovis*. No entanto, estudos realizados com *M. bovis* isolados na Irlanda do Norte, França, Austrália, Canadá, República da Irlanda e do Irã mostraram um poder limitado de discriminação deste método. MIRU-VNTR surgiu como

marcadores valiosos para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis* (ALLIX et al., 2006) e tornou-se a abordagem preferida para a tipificação de *M. bovis* (Mc LERNON et al., 2010).

Nos últimos anos, um progresso notável ocorreu na compreensão dos mecanismos de virulência e na patogênese de infecções micobacterianas particularmente pela aplicação do sequenciamento genômico e análise genômica comparativa. A ciência genômica tornou possível a elucidação do modelo genético completo de várias espécies de micobactérias de importância em medicina humana e veterinária, bem como espécies ambientais (OLSEN; BARLETTA; THOEN, 2010).

2.4.1 RFLP-IS*6110*

Um método de tipagem baseado na variação da sequência de DNA no genoma bacteriano denominado RFLP-IS*6110* 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 (COLLINS, 2011; HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; THIERRY et al., 1990).

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 IS*6110* é geralmente bastante elevado, sendo maior que vinte e cinco cópias (DEVALLOIS et al., 1998). Isto confere um elevado poder de discriminação desta técnica para esta espécie. Em contraste, a maioria dos isolados de *M. bovis* possui baixo número de cópias de IS*6110*, sendo o máximo de oito cópias encontradas em isolados (ARANAZ et al., 1996; COLLINS, 2011; COUSINS; DAWSON, 1999; DEVALLOIS et al., 1998; HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; KREMER et al., 1999). Esta é a razão pela qual RFLP-IS*6110* ainda é a técnica de referência para identificar *M. tuberculosis*, enquanto oferece baixa capacidade de identificação para a maioria dos isolados de *M. bovis* (KAMERBEEK et al., 1997). Outro fato a ser considerado é que o elemento IS*6110* é um membro da família de IS3, grupo de sequências de inserção mais difundido entre bactérias (Mc ADAM et al., 1990). Portanto, não é surpreendente que sequências homólogas a IS*6110* são também encontrado em micobactérias que não fazem parte do MTBC (Mc HUGH; GILLESPIE, 1998). Além de ser propenso a resultados falsos positivos, o alvo da IS*6110* para amplificação por PCR também pode produzir resultados falso-negativos (MAGDALENA et al, 1998).

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 cepas de *M. bovis*, o complexo clonal Europa 1, que geralmente apresenta uma cópia de IS*6110*.

2.4.2 *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 IS*6110* (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).

A técnica baseia-se na amplificação por PCR de um único locus altamente polimórfico no genoma da bactéria contendo múltiplas repetições diretas (DR). Este locus contém DR de 36 pb intercaladas com sequências espaçadoras não repetitivas de 34-41 pb bem conservadas. Posteriormente à PCR, é feita a hibridação em membrana que contenha oligonucleotídeos, previamente ligados covalentemente, e específicos para cada uma das 43 diferentes sequências espaçadoras. O resultado é obtido mediante a hibridação ou não de cada sequência espaçadora, de forma que o polimorfismo dos isolados é comprovado pela ausência ou presença de um ou mais espaçadores resultando em um padrão de hibridação que é comparado entre as diferentes amostras (ARANAZ et al., 1996; GROENEN et al., 1993; GOYAL et al., 1997). 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 no DNA que podem se transferir de uma região para outra do genoma, deixando ou não uma cópia no local onde estavam (ARANAZ et al., 1996).

Uma das vantagens da técnica é a rapidez, o custo baixo e a tipificação das cepas de *M. bovis*, assim como de *M. tuberculosis*. Além de ser capaz de distinguir especificidades geográficas entre seus *spoligotipos*, 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). Outra vantagem é a possibilidade de fazer análises e comparações genéticas e epidemiológicas dos diferentes perfis gerados por *Spoligotyping* do MTBC (BRUDEY et al. 2006; MALASPINA, 2009) por meio de um banco de dados internacional de *Spoligotyping* (SpolDB4) que atualmente compartilha 1.939 perfis,

representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 141 países (PEREIRA, 2012).

O poder de discriminação de isolados de *M. bovis* por *spoligotyping* varia entre países e regiões geográficas. Estudos usando *spoligotyping* em grandes populações bovinas 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; DAWSON, 1999), Irlanda do Norte (SKUCE et al., 2005) e Grã Bretanha (HEWINSON et al., 2006) foram prejudicados devido ao baixo índice de discriminação.

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 (ZUMÁRRAGA et al., 1999; 2013).

Alguns estudos demonstraram que apenas o *spoligotyping* não seria suficiente para todas as correlações epidemiológicas entre as cepas de *M. bovis*, especialmente, porque todo o polimorfismo genético está restrito a um único locus, ao agrupamento DR, havendo a necessidade de associações com outros métodos moleculares, já que o *spoligotyping* possui menor poder de discriminação (ARANAZ et al., 1996; COUSINS et al., 1998; KAMERBEEK et al.,1997; ROCHA et al., 2012).

2.4.3 MIRU-VNTR

Muitos loci possuem hipervariabilidade em seus números de repetições e são denominados de loci de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (NAKAMURA et al., 1988). Os VNRT são encontrados nas regiões intergênicas e não intergênicas no genoma, interferindo nos processos de regulação da célula e também possuem funções nas trocas moleculares dos microrganismos. São ferramentas de grande importância nos estudos evolutivos, assim como para os estudos de genética populacional de eucariotos (EPPLEN et al., 1997). O primeiro locus VNTR identificado no genoma de *M. tuberculosis* consistiu de uma repetição em tandem de 75 pb localizada no gene *katG* (GOYAL et al., 1994). Outros loci foram encontrados dispersos no genoma de micobactérias; Supply et al. (1997) denomiram estes loci de unidades micobacterianas repetitivas (MIRU), que variam em tamanho de 46-101 pb (RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012). Um estudo posterior de tipagem usando VNTR de isolados do MTBC reconheceu mais cinco repetições que foram chamadas de repetições exatas em tandem (ETR) A a F, estes variam de tamanho entre 53 e 79 pb

(FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998). No mesmo ano, Magdalena et al. (1998) identificaram uma região designada *SenX3-RegX3*, que apresentava elevado grau de conservação de sequência entre as cepas do MTBC, mais tarde essa região seria utilizada para a identificação de novas MIRU. Nos últimos anos, vários loci foram descritos, por exemplo, QUB11a, QUB11b, QUB18, QUB23, QUB26 (SKUCE et al., 2002).

A tipagem MIRU-VNTR visa loci genéticos que estão distribuídos por todo o genoma; esses loci contém uma variação na quantidade de sequências repetidas. O polimorfismo nos loci pode ocorrer tanto como mudança na sequência dos nucleotídeos, como na variação no número de unidades repetidas, consequentemente ambas criando uma variação alélica. A tipificação pelo MIRU-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 MIRU-VNTR), 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 bases) 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 MIRU-VNTR 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:

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

Uma vez determinado o perfil de alelos para cada cepa, os dados são analisados empregando um aplicativo web MIRU-VNTR*plus* (http://www.miru-vntrplus.org). Este serviço permite aos usuários acesso livre para analisar o perfil de alelos de seus isolados com os isolados de diferentes regiões do mundo, depositados no banco de dados, que representa as

principais linhagens do complexo *M. tuberculosis* (ALLIX-BEGUEC et al., 2008; WENIGER et al., 2010).

A técnica de MIRU-VNTR pode ser desenvolvida de forma manual como descrita anteriormente ou de maneira automatizada, o que é uma vantagem em relação à outras técnicas como o *spoligotyping*. Na metodologia automatizada emprega-se oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos específicos produzindo assim amplificados fluorescentes, que por sua vez podem ser analisados em um sequenciador automático de DNA. A determinação dos amplificados é obtida pelo sequenciador e a definição de qual locus ele representa é obtida pela cor da fluorescência detectada pelo aparelho. É importante salientar que os métodos automatizados são muito mais caros que a versão manual, sendo justificado seu uso apenas em estudos de grande número de amostras (PANDOLFI et al., 2007).

Estudos a fim de determinar um conjunto ideal de marcadores MIRU-VNTR para *M. bovis* são menos abundantes que para *M. tuberculosis*, no entanto a tipagem MIRU-VNTR foi usada em muitos países para estudos epidemiológicos de *M. bovis* (ALLIX et al., 2006; BONIOTTI et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2012; HILTY et al., 2005; JEON et al., 2008; MANDAL et al., 2011; McLERNON et al., 2010; PARREIRAS et al., 2012; ROCHA et al., 2012; ROMERO et al., 2008; RORING et al., 2002; 2004; SAHRAOUI et al., 2010; SKUCE et al., 2005; SUN et al., 2012).

Um estudo desenvolvido por Supply et al. (2006) analisou isolados do MTBC de várias partes do mundo. O resultado deste estudo permitiu padronizar um conjunto de 24 loci MIRU-VNTR, incluindo um subconjunto de 15 loci bastante discriminatório, para ser usado como um método de tipagem de primeira linha. Este conjunto de 24 loci demonstrou eficiência na discriminação de isolados de *M. tuberculosis* em relação ao conjunto de 12 loci originalmente sugeridos, com resultados altamente reprodutíveis e fáceis de serem trocados entre laboratórios (NOGUTI et al., 2010; PEREIRA, 2012).

Estudos populacionais mostraram que a tipagem MIRU-VNTR tem sido mais eficiente do que a ferramenta padrão-ouro de engenharia genética, RFLP-*IS6110*, no estudo da transmissão da tuberculose, em ambientes com características epidemiológicas representativas de muitos países desenvolvidos (COLLINS, 2011). A técnica MIRU-VNTR permite a identificação de cepas em circulação local ou internacional, o que é essencial para bons serviços de vigilância epidemiológica e controle de doenças (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004). Em contraste com *spoligotyping*, tipagem MIRU-VNTR tem a vantagem de ser uma técnica multilocus, no entanto, isso é de relativa importância para um organismo

puramente clonal e suscetível a homoplasia, onde polimorfismo em qualquer lugar marca o cromossomo inteiro e pode fazer com que clones independentes possuam o mesmo perfil. No entanto este problema pode ser minimizado pela utilização de maior número de loci MIRU-VNTR. Não há dúvida de que a tipificação MIRU-VNTR pode identificar genótipos mais do que RFLP-*IS6110* e *spoligotyping* (COLLINS, 2011; HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; SMITH et al., 2006).

2.4.4 MST/MLST/MLSA

O *Multispacer* (*Multilocus*) *Sequence Typing* (MST) é um dos métodos de genotipagem utilizados atualmente em estudos de epidemiologia molecular. A discriminação de cepas de microrganismos por essa técnica é feita pela detecção de polimorfismos em várias regiões do genoma, principalmente em sequências espaçadoras intergênicas (DRANCOURT et al., 2004 apud SALES, 2012; PITONDO-SILVA et al., 2013). Este método demanda pequenas quantidades de DNA e se mostra vantajoso por ser uma técnica baseada em sequenciamento, o que permite reconhecer toda a diversidade genética dos marcadores utilizados e ainda permite a comparação de resultados *in silico*. A determinação das sequências espaçadoras intergênicas requer várias etapas. A primeira delas é localizar as sequências bacterianas no *GenBank*, que uma vez localizadas, deverão ser alinhadas e comparadas. Após a escolha das sequências para o estudo, essas serão utilizadas em PCR e sequenciamento dos fragmentos de interesse (SALES, 2012). O sequenciamento em larga escala dessas sequências consome muito tempo e muito material de laboratório, de forma que o emprego do MST na rotina é limitado (SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 2012).

Outros dois sistemas de tipificação de *M. bovis* já são utilizados, o SNP e o WGS, porém ainda estão em fase de padronização para *M. bovis* e somente são realizados em grandes centros de diagnóstico fora do Brasil.

2.4.5 SNP

O polimorfismo de base única do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) é caracterizado pela substituição de uma base nucleotídica por outra na sequência no DNA, são variações individuais num ponto particular do genoma, podendo consistir em inserções, deleções ou substituições nucleotídicas. Um SNP pode ser sinônimo ou não-sinônimo: no primeiro caso (também conhecido como sSNP), o aminoácido codificado pelo códon que

contém o SNP é o mesmo que aquele codificado pelo códon sem o SNP; e no segundo caso (também conhecido como nsSNP), o códon modificado codifica um resíduo de aminoácido diferente daquele codificado pelo códon sem o SNP (ALENCAR, 2010). O SNP sinônimo é muito utilizado para identificar linhagens, por causa da baixa diversidade, ancestralidade recente e a ausência de transferência de genes horizontal dentro do complexo *M. tuberculosis*. Diferentes técnicas que permitem a detecção de SNPs em ensaios de elevado rendimento tem sido desenvolvidas e são utilizadas para distinguir cepas de bactérias (GUTACKER et al., 2002.) e em estudos filogenéticos (ALLAND et al., 2003; GUTACKER et al., 2002; HUGHES; FRIEDMAN; MURRAY, 2002). No entanto, os SNPs apresentam algumas desvantagens, como a impossibilidade de estimar a distância genética (PEARSON et al., 2009; SMITH et al., 2009). A determinação de SNPs requer um processo em duas etapas (PCR e sequenciamento). Embora os SNPs são bem adequados para definir as relações filogenéticas profundamente enraizadas, são de limitado valor para tipagem molecular de rotina, devido o alto custo (SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 2012).

2.4.6 WGS

O sequenciamento genômico do inglês *Whole Genome Sequencing* (WGS) teoricamente monitora toda a variação de um genoma bacteriano, e tem, por conseguinte maior poder de discriminação. Dependendo da necessidade do estudo, dada a quantidade dos dados, pode ser ajustado para extrair apenas a informação desejada a partir da sequência no genoma (San MILLÁN; GARAIZAR; BIKANDI, 2005). Inicialmente os sequenciamentos eram realizados pelo método Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) que envolve incorporação de dideoxinucleotídeo como terminador. Para o sequenciamento mais eficiente e rentável de genomas, a segunda geração de sequenciamento de DNA foram exploradas nos últimos cinco anos, como as técnicas de pirosequenciamento [Sequencimento 454/Roche (MARGULIES et al., 2005)] ou através do sequenciamento por síntese [Solexa / Illumina (ANSORGE, 2009)]. Com essas técnicas de leitura curta, às vezes em combinação com tipagem por SNP, cadeias de transmissão da tuberculose puderam ser determinadas em um grande grupo de mesmo perfil de RFLP-IS*6110* (SCHÜRCH et al., 2010), cepas multi-drogas resistentes foram caracterizadas (IOERGER et al., 2009) e foi estimada a divergência genética de isolados de mesmo perfil genético (NIEMANN et al., 2009).

Outra vantagem do WGS é que a reconstrução de relações filogenéticas baseia-se numa grande quantidade de dados (COMAS et al., 2010; SCHÜRCH et al., 2011), que permite reconstruir uma filogenia de confiança mesmo de cepas intimamente relacionadas (SCHÜRCH et al., 2011). No futuro, WGS poderá ajudar na identificação de forças seletivas que atuam em cepas durante surtos, na compreensão de eventos micro-evolutivos dentro de uma população de bactérias de um paciente ou na transmissão de paciente para paciente, na identificação das mutações que levam a resistência a drogas e mutações em genes de virulência. O WGS ainda não é utilizado na rotina, principalmente por causa dos custos e da complexidade na análise dos dados (SCHÜRCH; van SOOLINGEN, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

– Estudar a diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* presentes em rebanhos bovinos associadas a sua localização geográfica.

3.2 Específicos

– Realizar a genotipagem de isolados de *Mycobacterium bovis* com 24 loci da técnica MIRU-VNTR;
– Descrever a diversidade alélica de cada um dos 24 loci analisados; e
– Analisar a relação genética entre os isolados de *M. bovis*.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **ZOONOSES AND COMMUNICABLE DISEASES COMMON TO MAN AND ANIMALS**. 3rd. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 2001. 378.

ALENCAR, S. A. **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas**. 2010, 128p. Tese (Doutorado em Bioinformática) ─ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

ALLAND, D. et al. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: Application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. **Journal of Bacteriology,** v. 185, n. 11, p. 3392-3399, 2003.

ALLIX, C. et al. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS*6110* restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 44, n. 6, p. 1951-1962, 2006.

ALLIX-BEGUEC, C. et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR*plus*, 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, p. 2692-2699, 2008.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology,** v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.

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, 1996.

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. 662-669, 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.

BERGEY, D.H. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Baltimore: The William & Willis, Baltimore.1923.

BOER, A. S. et al. Analysis of rate of change of IS*6110* RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. **Journal of Infectious Diseases,** v. 180, n. 4, p. 1238-1244, 1999.

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. 636-644, 2009.

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.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Norma Interna SDA 02/2012**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretária de Defesa Agropecuária, 4p. 2012.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BRUDEY, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology,** v. 6, n. 23, p. 1-17, 2006.

CHOI, G. E. et al. Application of Single-nucleotide Polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats Analyses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. **Korean Journal of Laboratory Medicine,** v. 31, n. 1, p. 37-43, 2011.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COLLINS, C. H.; YATES, M. D.; GRANGE, J. M. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. **The Journal of Hygiene,** v. 89, n. 2, p. 235-242, 1982.

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

COMAS, I. et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. **Nature Genetics,** v. 42, n. 6, p. 498-503, 2010.

COMAS, I.; GAGNEUX, S. The past and future of tuberculosis research. **Plos Pathogens,** v. 5, n. 10, p. 1-7, 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. Mycobacterial infections in multiple species: Implications for diagnosis and control. **Veterinary Journal,** v. 191, n. 2, p.141-142, 2012.

COUSINS, D.; DAWSON, D. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease,** v. 3, n. 8, p. 715-721, 1999.

COUSINS, D. et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 36, n. 1, p. 168-178, 1998.

COWAN, L. et al. Variable-number-tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS*6110* by using mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 40, n. 5, p. 1592-1602, 2002.

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

DRANCOURT, M. et al. Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and Plague Pandemics. **Emerging Infectious Diseases,** v.10, n.9, p.1585-1592, 2004.

DUARTE, E. L. et al. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. **Veterinary Microbiology,** v. 130, n. 3-4, p. 415-421, 2008.

DUARTE, E. L. et al. Bovine tuberculosis transmission between domestic and feral species in Portugal: first molecular evidences in *Mycobacterium bovis* isolates from a farm in Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias,** v. 102, n. 563-564, p. 299-303, 2007.

DURR, P.; HEWINSON, R.; CLIFTON-HADLEY, R. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis - I. *Mycobacterium bovis* genotyping. **Revue Scientifique Et Technique De L Office International des Epizooties,** v. 19, n. 3, p. 675-688, 2000.

EPPLEN, C et al. On simple repetitive DNA sequence and complex diseases. **Electrophoris**, v. 18, p. 1577-1585, 1997.

FIGUEIREDO, S.M. et al. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.9, p.712-716, 2010.

FIGUEIREDO, E. E. D. S. et al. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. **The Veterinary Journal,** v. 193, n. 1, p. 296-298, 2012.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology,** v. 19, p. 93-129, 2001.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology** v. 153, n. 12, p. 1135-41, 2001.

FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology-Uk,** v. 144, n. 5, p. 1189-1196, 1998.

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. 7877–7882, 2003.

GORDON, S. V. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology,** v. 32, n. 3, p. 643-655, 1999.

GOYAL, M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS*6110* restriction fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 35, n. 3, p. 647-651, 1997.

GOYAL, M. et al. PCR amplification of variable sequence upstream of *kat*g gene to subdivide strains of *Mycobacterium-tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 32, n. 12, p. 3070-3071, 1994.

GROENEN, P. M. A. et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium-tuberculosis* - application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology,** v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

GUTACKER, M. M. et al. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. **Genetics,** v. 162, n. 4, p. 1533-1543, 2002.

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.

HADDAD, N. et al. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 39, n. 10, p. 3623-3632, 2001.

HARRIS, N. B. Molecular techniques: applications in epidemiologic studies. *In* ***Mycobacterium bovis*** **Infection in animals and Humans** . C. O.Thoen , J. H. Steele , and M. J. Gilsdorf (eds.).Ames : Blackwell Publishing , p. 54 – 62, 2006.

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, p. 127-139, 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, 2005.

HOMEM, V.S.F. **Brucelose e tuberculose bovinas no município de Pirassununga, SP: prevalências, fatores de risco e estudo econômico**. 2003, 112 f. Tese (Doutorado) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

HUGHES, A. L.; FRIEDMAN, R.; MURRAY, M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerging Infectious Diseases,** v. 8, n. 11, p. 1342-1346, 2002.

IOERGER, T. R. et al. Genome Analysis of Multi-andExtensively-Drug-Resistant Tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa. **Plos One,** v. 4, n. 11, p. 1-9, 2009.

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, p. 145-153, 2008.

JONES, W. D. Bacteriophage-typing of *Mycobacterium-tuberculosis* cultures from incidents of suspected laboratory cross-contamination. **Tubercle,** v. 69, n. 1, p. 43-46,1988.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **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. **Molecular Microbiology,** v. 56, n. 1, p. 163-174, 2005.

KREMER, K. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

LAVAGNOLI, M. R. et al. Tuberculose em bovinos no estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n. 1, p. 71-78, 2010.

LÔBO, J. R. **Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina.** 2008, 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MAGDALENA, J. et al. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 36, n. 4, p. 937-943, 1998.

MALASPINA, A. C. **Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando RFLP e Spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP**. 2009, 97p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2009.

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, 2011.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature,** v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

Mc ADAM, R. A. et al. Characterization of a *Mycobacterium-tuberculosis* insertion-sequence belonging to the IS3 family. **Molecular Microbiology,** v. 4, n. 9, p. 1607-1613, 1990.

Mc HUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Nonrandom association of IS*6110* and *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for molecular epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 36, n. 5, p. 1410-1413, 1998.

Mc LERNON, 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, p. 4541-4545, 2010.

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, 2010.

MOSTOWY, S. et al. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. **Journal of Bacteriology,** v. 187, n. 18, p. 6386-6395, 2005.

MUELLER, B. et al. African 1, an Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. **Journal of Bacteriology,** v. 191, n. 6, p. 1951-1960, 2009.

NAKAMURA, Y et al. Variable numer of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, v. 4796, p.1616 – 1622, 1987.

NESPOLI, J. M. B**. Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso**. 2012, 44 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-28092012-165944/>. Acesso em: 27-06-2013.

NIEMANN, S. et al. Genomic Diversity among Drug Sensitive and Multidrug Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with Identical DNA Fingerprints. **Plos One,** v. 4, n. 10, p. 1-7, 2009.

NOGUTI, E.N. et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 105, n. 6, p. 779-785, 2010.

OIE - World Organisation for Animal Health. **Bovine Tuberculosis** *In:* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5ed. Paris: OIE, p. 1-16, 2009.

OLMSTEAD, A. L.; RHODE, P. W. An impossible undertaking: The eradication of bovine tuberculosis in the United States. **Journal of Economic History,** v. 64, n. 3, p. 734-772, 2004.

OLSEN, I.; BARLETTA. R.G.; THOEN, C.O., Mycobacterium. *In:* GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.;THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.** Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p. 113-132, 2010.

PANDOLFI, J.R. et al . Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas,** v. 28, n. 3, p. 251-257, 2007.

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.

PEARSON, T. et al. Phylogenetic understanding of clonal populations in an era of whole genome sequencing. **Infection Genetics and Evolution,** v. 9, n. 5, p. 1010-1019, 2009.

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, p. 1132-47, 2009.

PEREIRA, A. M. **Georreferenciamento e Genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de MIRU-VNTR**, 2012, 110 f. Dissertação (Mestrado Medicina Tropical e Saúde Pública) ─ Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2012.

PITONDO-SILVA, A. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods,** v.93, p. 42–48, 2013.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Veterinary Journal,** v. 163, n. 2, p. 115-127, 2002.

POLLOCK, J. M. et al. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology,** v. 112, n. 2-4, p. 141-150, 2006.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology,** v. 46, n. 3, p. 709-717, 2002.

REVIRIEGO GORDEJO, F. J.; VERMEERSCH, J. P. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. **Veterinary Microbiology,** v. 112, n. 2-4, p. 101-109, 2006.

RHODES, S. G. **The cattle model of tuberculosis: studies in the natural host**. In: Focus on Tuberculosis Research, p. 187-201, 2005.

ROCHA, V. C. et al. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector and Borne Zoonotic Disease**, v. 12, n. 20, p. 1-5, 2012.

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.

RODRÍGUEZ-CAMPOS, S. **Epidemiología molecular de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* en España**. 2012. 356p. Tese. Departamento de Sanidad Anima del Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2012.

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, p; 87-95, 2008.

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, 2002.

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, p. 449-453, 2010.

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

San MILLÁN, R.; GARAIZAR, J.; BIKANDI, J. *In silico* simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. **In Silico Biology,** v. 5, n. 3, p. 341-6, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHUITEMAKER, A. G. **Bacteriphages lysing mycobacteria**. Thesis, The Netherlands. 1968.

SCHÜRCH, A. C. et al. Mutations in the regulatory network underlie the recent clonal expansion of a dominant subclone of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. **Infection Genetics and Evolution,** v. 11, n. 3, p. 587-597, 2011.

SCHÜRCH, A. C.; VAN SOOLINGEN, D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: From phage typing to whole-genome sequencing. **Infection Genetics and Evolution,** v. 12, n. 4, p. 602-609, 2012.

SCHÜRCH, A. C. et al. The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. **Infection Genetics and Evolution,** v. 10, n. 1, p. 108-114, 2010.

SKUCE, R. A. et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiology-Sgm,** v. 148, n. 2, p. 519-528, 2002.

SKUCE, R. A. et al. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTR). **Veterinary Record,** v. 157, n. 17, p. 501-504, 2005.

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

SMITH, N. H. 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. et al. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: Clonal expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 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, 2006.

SMITH, N. H. et al. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology,** v. 7, n. 7, p. 537-544, 2009.

SNIDER, D. E.; JONES, W. D.; GOOD, R. C. The usefulness of phage typing *Mycobacterium-tuberculosis* isolates. **American Review of Respiratory Disease,** v. 130, n. 6, p. 1095-1099, 1984.

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, p. 404-414, 1999.

STRAIN, S. A. J.; McNAIR, J.; McDOWELL, S.W.J. **Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle**. McDowell, Agri-Food and Biosciences Institute**:** 45 p. 2011.

SUN, Z. et al. Evaluation of Spoligotyping and MIRU-VNTR for *Mycobacterium bovis* in Xinjiang, China. **Research in Veterinary Science,** v. 92, n. 2, p. 236-239, 2012.

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, 2006.

SUPPLY, P. et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology,** v. 26, n. 5, p. 991-1003, 1997.

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, p.26-50, 1993.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infection Control and Hospital Epidemiology,** v. 18, n. 6, p. 426-39, 1997.

THIERRY, D. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS*6110*, and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 28, n. 12, p. 2668-73, 1990.

THOEN, C. O. et al. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana,** v. 45, n. 1, p. 135-81, 2009.

TORTOLI, E. Phylogeny of the genus Mycobacterium: Many doubts, few certainties. **Infection Genetics and Evolution,** v. 12, n. 4, p.827-831, 2012.

VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R.; BRAGA, M. J. Determinantes do Uso de Medidas Sanitárias de Controle da Brucelose e Tuberculose Bovinas. **Revista de Economia e Sociologia Rural,** v. 49, n. 01, p. 215-232, 2011.

Van BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 62, n. 2, p. 275-293, 1998.

Van EMBDEN, J. D. A. V. 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, 1993.

WENIGER, T. et al. MIRU-VNTR*plus*: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research,** v. 38, p. 326-331, 2010.

WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Plos Pathogens,** v. 4, n. 9, p. 1-10, 2008.

WIRTH, T.; MEYER, A.; ACHTMAN, M. Deciphering host migrations and origins by means of their microbes. **Molecular Ecology,** v. 14, n. 11, p. 3289-3306, 2005.

ZUMÁRRAGA, M. et al. A 12 center dot 7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. **Microbiology-Uk,** v. 145, n. 4. p. 893-897, 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.

ARTIGO 1

Discriminação genética por meio de 24 loci MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* de diferentes regiões do Brasil

A ser submetido à Revista Research in Veterinary Science

Discriminação genética por meio de 24 loci MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* de diferentes regiões do Brasil

A.F. Souza-Filho[a*], A.L.A.R. Osório[a], K.S.G. Jorge[a], F.R. Araújo[b], A.O. Pellegrin[c], C.E.S. Vidal[d], C.P.Araújo[a], L.A.G. Albertti[a]

[a] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

[b] Embrapa Gado de Corte, Brasil

[c] Embrapa Pantanal, Brasil

[d] Universidade Federal de Santa Maria; Superintendência Federal da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Rio Grande do Sul, Brasil

[*]Autor para correspondência. Endereço: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Avenida Senador Filinto Muller, 2443, Vila Ipiranga, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. Tel.: +55 67 33453613; fax: +55 67 33453600. E-mail: antoniosouzafilho@gmail.com (A.F. SOUZA-FILHO).

Abstract

Fifty-five strains of acid-fast bacilli obtained from the cultivation of tissues removed during slaughter cattle from 19 properties of four Brazilian states, were genotyped by MIRU-VNTR technique with 24 primers. Twenty-two genetic profiles were detected, 13 profiles with more than one strain (cluster) and nine unique isolates. From 24 loci studied, 11 showed no allelic diversity and the ones which showed diversity is mostly in the VNTR and ETR loci. The MIRU-VNTR technique with 24 primers allows identification of genetic diversity of *M. bovis* in different geographical areas of Brazil, represented by multiple infections as well as by meeting of the same profile of *M. bovis* in different locations, resulting in indiscriminate movement of diseased animals. Clustered isolates are indicative of recent transmission and unique profile isolates suggest reactivation of latent infection.

Keywords: MIRU-VNTR, genetic diversity, bovine tuberculosis, gene clusters, *Mycobacterium bovis*, genotyping.

Resumo

Cinquenta e cinco isolados de bacilos álcool-ácido resistentes, obtidos a partir do cultivo de tecidos colhidos durante o abate de bovinos provenientes de 19 propriedades de quatro estados brasileiros, foram genotipados por meio da técnica MIRU-VNTR com 24 iniciadores. Vinte e dois perfis genéticos foram observados, sendo 13 perfis com mais de uma cepa (agrupamentos) e nove isolados de perfil único. Dos 24 loci estudados, em 11 não houve qualquer diversidade alélica e a maioria que apresentou diversidade alélica está nos loci ETR e VNTR. A técnica de MIRU-VNTR com 24 iniciadores permite a identificação da diversidade genética de *M. bovis* em diferentes áreas geográficas do Brasil, representada por superinfecção, assim como pelo encontro do mesmo perfil de *M. bovis* em diferentes localidades, consequente a movimentação indiscriminada de animais doentes. Agrupamentos de isolados são indicativos de transmissão recente e isolados de perfil único sugerem reativação de infecção latente.

Palavras-chave: MIRU-VNTR, diversidade genética, tuberculose bovina, agrupamentos genéticos, *Mycobacterium bovis*, genotipagem.

1. Introdução

Avanços nas técnicas de tipagem molecular têm contribuído para o estudo epidemiológico de doenças infecciosas como a tuberculose bovina, por meio da identificação e caracterização de isolados de *Mycobacterium bovis*. Os dados de tipagem molecular permitem discernir os genótipos de *M. bovis* que são predominantes em uma área específica e como os focos múltiplos ocorrem. Além disso, essa informação epidemiológica oferece dados para rastrear a origem dos surtos e assim bloquear a transmissão da tuberculose bovina. A técnica de MIRU-VNTR é uma poderosa ferramenta para a identificação e genotipagem do

complexo *M. tuberculosis*, inclusive *M. bovis* (Roring et al., 2002; Hilty et al., 2005) especialmente quando 24 loci são analisados (Maes et al., 2008).

A proposta deste estudo foi analisar a diversidade genética de isolados de *M. bovis* presentes em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. AMOSTRAS

Os isolados de *M. bovis*, objeto deste estudo foram provenientes de 4 estados brasileiros, 24 isolados de 13 propriedades de Mato Grosso do Sul, 26 isolados de 4 propriedades do Rio Grande do Sul, 4 isolados de uma propriedade do Espirito Santo e 1 isolado de Pernambuco.

Os isolados foram obtidos a partir de amostras de tecido colhidas durante abate em matadouros frigoríficos ou durante necropsia e cultivadas em meio de Stonebrink. Colônias características de *M. bovis* foram confirmadas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) quando corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. O DNA genômico dessas amostras foi extraído por meio de termólise (Mazars et al., 2001) e utilizados para amplificação das sequências alvo (RvD1Rv2031c) a partir dos iniciadores JB21 e JB22 (Rodriguez et al., 1995).

2.2.GENOTIPAGEM MIRU-VNTR

As 55 amostras clínicas identificadas como espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a cepa referência *M. bovis* AN5 foram genotipadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com 24 iniciadores (Supply, 2005; Supply et al., 2006). Em cada reação foram utilizados 6,4 µl de *Go Taq Green Master Mix* 1x (Promega®), 0,3 pmol de cada iniciador, 100 ηg de DNA e água livre de nucleases suficiente para o volume final de 18 µl.

Amostra de *M. tuberculosis* estirpe H37Rv e água livre de nucleases foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

A amplificação foi realizada em termociclador MJ *Mini Personal Thermal Cycler* (Bio-Rad®), conforme Supply (2005). Os produtos amplificados de tamanho variável, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% e solução tampão TBE 1x (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) a uma voltagem de 120 volts, 400 mÅ durante 300 minutos, em migração paralela a padrão de 100 pares de bases em três posições equidistantes (PCR *Low Ladder Marker Set* - Sigma®).

Terminada a migração o gel foi mergulhado em uma solução de TBE 1x e corante *Sybr Gold* (Invitrogen®) na proporção 1 : 50.000. Depois de 40 minutos de coloração o gel foi colocado no sistema de fotodocumentação *Gel Doc* XR (Bio-Rad®) e as imagens das bandas capturadas por meio do software *Quantity One* (Bio-Rad®). Depois de corado e fotodocumentado, determinou-se o número de pares de bases nos fragmentos de todas as amostras para cada locus.

A quantidade de alelos foi determinada de acordo com a tabela publicada por Supply (2005), que relaciona o tamanho do fragmento obtido com a quantidade de cópias. Baseado na quantidade de alelos, cada amostra recebeu um código numérico que foi usado para descrever seu perfil genético. O teste foi considerado válido quando o resultado do controle positivo era correspondente ao obtido por Supply (2005). O perfil genético foi utilizado na comparação do perfil de cada isolado com cepas depositadas no aplicativo MIRU-VNTR*plus* (http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index). Foi utilizado o ponto de corte de 0,17 (padrão do aplicativo), que corresponde a uma tolerância de até quatro loci de diferença, para analisar a similaridade entre a cepa em estudo e as cepas depositadas.

O perfil genético dos isolados em estudo e das cepas de *M. bovis* 1601/01, 4258/00, 53.46/02, 9564/00, 8217/02, 1290/00, 7540/01 e *M. caprae* 8986/99, depositadas no

aplicativo, além do perfil das cepas H37Rv e AN5 obtidas durante o estudo, foi utilizado na geração do dendrograma pelo método UPGMA.

2.3. ANÁLISE DE DIVERSIDADE ALÉLICA

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 freqüência do alelo *i* no locus e *n* o número de isolados. Com base nesse índice, o locus é considerado altamente discriminatório/polimórfico se $h > 0{,}6$; moderadamente se $0{,}3 \leq h \leq 0{,}6$ e fracamente se $h < 0{,}3$ (Sola et al., 2003).

2.4. ANÁLISE DO PODER DE DISCRIMINAÇÃO

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*.

A técnica de MIRU-VNTR é considerada eficiente se apresentar índice de pelo menos 90% (Hunter e Gaston, 1988).

3. Resultados

Vinte e dois perfis genéticos foram identificados a partir de 55 isolados de *M. bovis*, provenientes de 19 propriedades de quatro estados brasileiros. O perfil genético, de cada um dos 55 isolados, obtido a partir de genotipagem MIRU-VNTR pode ser visualizado na tabela

1. O poder discriminatório dos 24 loci de MIRU-VNTR, nas amostras estudadas foi de 0.9123.

Nos estados de Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Espirito Santo foram identificados, respectivamente, 12, 08 e 03 perfis genéticos de *M. bovis*, além do perfil distinto obtido no estado de Pernambuco.

Dois perfis genéticos, “b” e “o”, foram identificados tanto no estado de Mato Grosso do Sul como no Rio Grande do Sul.

No Mato Grosso do Sul, um mesmo perfil de *M. bovis* “k” foi identificado em diferentes propriedades (G, H, P, Q) de cidades distintas. Além disso, outro perfil “s” foi identificado em duas propriedades (R e S) do mesmo município.

Nas propriedades C, H e S foram identificados três perfis diferentes de *M. bovis*, enquanto que nas propriedades K e O dois perfis distintos, caracterizando superinfecção.

Na comparação do perfil das amostras estudadas observou-se que a maioria (89.29%) apresenta perfil similar com cepas de *M. bovis* depositadas no aplicativo MIRU-VNTR*plus*.

No dendrograma (figura) observam-se 22 perfis genéticos distintos, 13 perfis com mais de um cepa (agrupamentos) e nove isolados de perfil único.

A distribuição dos isolados de acordo com a quantidade de alelos em cada locus e a análise da diversidade alélica dos 24 loci está sumarizada na tabela 2. Dos 24 loci estudados em 11 não houve qualquer diversidade alélica e a maioria que apresentou diversidade alélica está nos loci ETR e VNTR.

Falhas de amplificação ocorreram nos loci MIRU 16, MIRU 31, ETR B e QUB 26 mesmo após várias tentativas.

4. Discussão

No Brasil, pela primeira vez estudou-se a diversidade genética de cepas de *M. bovis* por MIRU-VNTR com 24 pares de iniciadores. As 55 amostras genotipadas evidenciaram por meio dessa técnica 22 perfis genéticos distintos. Isso sugere alta diversidade de *M. bovis* nos estados estudados. Essa alta diversidade pode ser consequência da movimentação indiscriminada de animais doentes (Zumárraga et al., 2013). A movimentação de animais doentes pode ser devido à dificuldade no diagnóstico da tuberculose, que é uma doença insidiosa, cujo diagnóstico indireto *in vivo* falha em distinguir animais anérgicos (Lepper et al., 1977). Além disso, podem ocorrer por falhas no saneamento dos focos e no controle de trânsito animal.

Cepas oriundas de diferentes estados com mesmo perfil podem ser resultantes da movimentação de animais contaminados entre diferentes regiões. Em geral, um grupo de cepas com o mesmo perfil é descendente de uma célula ancestral, porém nem sempre é possível afirmar isso devido à homoplasia, que faz com cepas sem relação de ancestralidade tenham o mesmo perfil MIRU-VNTR (Gibson et al., 2005; Filliol et al., 2006; Smith et al., 2006). De forma semelhante, no Mato Grosso do Sul foi encontrado o mesmo perfil em diferentes localidades, isso também pode ser justificado pela movimentação dos animais que faz com que diferentes animais em diferentes localizações se contamine com a mesma cepa de *M. bovis*, ou seja, um clone que se introduziu em certa área geográfica (efeito fundador) e se expandiu, multiplicando-se na ausência de competição (clone dominante ou endêmico). Outra hipótese é a seleção natural da cepa (Smith et al., 2006). Em cepas de *M. tuberculosis* sugere-se que o processo de seleção seja devido a forma de transmissão, por meio de aerossóis que contem provavelmente pequeno número de bactérias, levando a uma seleção aleatória durante a transmissão entre os seres humanos. Tal seleção pode contribuir para que essa característica

se torne fixa na população (Hershberg et al., 2008). O mesmo poderia estar ocorrendo com *M. bovis*.

A presença de diferentes genótipos de *M. bovis* no mesmo rebanho caracteriza superinfecção. Isso ocorre devido a diferentes fontes de infecção intra-rebanho (Salamon et al., 2000) ou falta de controle sanitário na entrada de animais na propriedade.

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 (Dale et al., 1999; Ferrazoli et al., 2000; Van Soolingen, 2001). Os isolados de perfil único não estabelecem vínculo epidemiológico com as demais cepas, sugerem doença proveniente de reativação de uma infecção latente, indicando que a infecção primária tenha ocorrido em diferentes contextos geográficos e temporais (Ferrazoli et al., 2000; Van Soolingen, 2001; García de Viedma et al., 2011).

A similaridade encontrada entre as cepas em estudo e aquelas de outros continentes, depositadas no aplicativo, pode ser explicada pela importação de animais e a evolução clonal de *M. bovis*. Segundo Zumárraga et al. (2013), os espoligotipos predominantes na América Latina são similares aos encontrados em países europeus, em decorrência das relações econômicas entre esses países a partir da metade do século XIX.

Os loci mais polimórficos (ETR e VNTR) encontrados neste estudo estão consistentes com estudos anteriores de Rocha et al. (2012) e Figueiredo et al. (2012) que observaram que os loci ETR são altamente polimórficos. No entanto, nenhum estudo com isolados *M. bovis* no Brasil até hoje utilizou os loci VNTR. Allix et al. (2006), estudando população de *M. bovis* na Irlanda, encontraram que os loci mais polimórficos foram: VNTR 3232, ETR-B, ETR-A, MIRU-26, QUB11b, QUB11a, ETR-C, VNTR 4156 e MIRU 4. Certos loci mostram mais

diversidade alélica do que outros, o que pode ser devido a diferentes pressões de seleção que atuam em diferentes loci (Gibson et al., 2005).

Os loci MIRU-VNTR podem exibir poder discriminatório diferente em diferentes linhagens de micobactérias. Para maximizar o poder discriminatório e minimizar os custos com genotipagem, Comas et al. (2009) sugeriram que apenas os marcadores VNTR, que oferecem maior poder discriminatório dentro de uma linhagem em particular, devem ser usados. A não observação de qualquer diversidade alélica em 11 dos 24 loci estudados neste trabalho pode servir de parâmetro para seleção das sequências discriminatórias, embora a escolha do conjunto dos loci mais apropriados para genotipagem não é consensual nem está uniformizada para todos os laboratórios. Assim os iniciadores ETR-B, ETR-A, QUB-26, VNTR 1955, VNTR 43 (ERT-C), VNTR 2163b, MIRU 16, VNTR 53, MIRU 31, MIRU 26, VNTR 42, VNTR 49, MIRU 27, por apresentarem polimorfismo são sugeridos para análise de diversidade genética de cepas de *M. bovis* no Brasil.

A não amplificação em alguns loci, mesmo depois de repetidas tentativas pode ter ocorrido devido mutações ou a degradação do DNA que impediram o anelamento dos iniciadores, levando a não amplificação dessas regiões genômicas. Esses problemas podem ser elucidados por meio de sequenciamento, que poderá mostrar variações na sequência dos loci. Nestes casos os genótipos ainda podem ser comparados de forma confiável com base na caracterização dos demais loci (Supply et al., 2006), principalmente devido a análise de similaridade tolerar diferença de até 4 loci em comparação com as cepas depositadas.

5. Conclusão

A técnica de MIRU-VNTR com 24 pares de iniciadores permite a identificação da diversidade genética de *M. bovis* em diferentes áreas geográficas do Brasil, representada por superinfecção, assim como pelo encontro do mesmo perfil de *M. bovis* em diferentes localidades, consequente a movimentação indiscriminada de animais doentes. Agrupamentos

de isolados são indicativos de transmissão recente e isolados de perfil único sugerem reativação de infecção latente.

Referências

Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS*6110* restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. Journal of Clinical Microbiology 44, 1951–1962.

Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., Gagneux, S., 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS One 4, e7815.

Dale, J.W., Nor, R.M., Ramayah, S., Tang, T.H., Zainuddin, Z.F., 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. Journal of Clinical Microbiology 37, 1265-1268.

Ferrazoli, L., Palaci, M., Marques, L.R., Jamal, L.F., Afiune, J.B., Chimara, E., Martins, M.C., Silva Telles, M.A., Oliveira, C.A., Palhares, M.C., Spada, D.T., Riley, L.W., 2000. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 4, 18-25.

Figueiredo, E.E.d.S., Ramos, D.F., Medeiros, L., Silvestre, F.G., Lilenbaum, W., Silva, J.T., Flosi Paschoalin, V.M., Dellagostin, O.A., 2012. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. Veterinary Journal 193, 296-298.

Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W.H., Hazbon, M.H., del Valle, M.B., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerrero, M.I., Leon, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendon, A., Sifuentes-Osornio, J.,

de Leon, A.P., Cave, M.D., Fleischmann, R., Whittam, T.S., Alland, D., 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. Journal of Bacteriology 188, 759-772.

García de Viedma, D., Mokrousov, I., Rastogi, N., 2011. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29 Suppl 1, 8-13.

Gibson, A., Brown, T., Baker, L., Drobniewski, F., 2005. Can 15-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis provide insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*? Applied and Environmental Microbiology 71, 8207-8213.

Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S., 2008. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. Plos Biology 6, 2658-2671.

Hilty, M., Diguimbaye, C., Schelling, E., Baggi, F., Tanner, M., Zinsstag, J., 2005. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. Veterinary Microbiology 109, 217-222.

Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems - an application of simpsons index of diversity. Journal of Clinical Microbiology 26, 2465-2466.

Lepper, A.W.D., Pearson, C.W., Corner, L.A., 1977. Anergy to tuberculin in beef-cattle. Australian Veterinary Journal 53, 214-216.

Maes, M., Kremer, K., van Soolingen, D., Takiff, H., de Waard, J.H., 2008. 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. Tuberculosis 88, 490-494.

Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P., 2001. 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 98, 1901-1906.

Rocha, V.C., de Figueiredo, S.C., Rosales, C.A., de Hildebrand E Grisi Filho, J.H., Keid, L.B., Soares, R.M., Ferreira Neto, J.S., 2012. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. Vector and Borne Zoonotic Disease 12, 1-5.

Rodriguez, J.G., Mejia, G.A., Delportillo, P., Patarroyo, M.E., Murillo, L.A., 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium-bovis* by PCR. Microbiology-Uk 141, 2131-2138.

Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., Skuce, R., 2002. 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 40, 2126-2133.

Salamon, H., Behr, M.A., Rhee, J.T., Small, P.M., 2000. Genetic distances for the study of infectious disease epidemiology. American Journal of Epidemiology 151, 324-334.

Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population-genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology 51, 873-884.

Smith, N.H., Gordon, S.V., de la Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nature Reviews Microbiology 4, 670-681.

Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., Rastogi, N., 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infection, Genetics and Evolution 3, 125-133.

Supply, P. 2005. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (Lille, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille), 73.

Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Soolingen, D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology 44, 4498-4510.

Van Soolingen, D., 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. Journal of Internal Medicine 249, 1-26.

Zumárraga, M.J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-Marín, L., de Waard, J., Estrada-Garcia, I., Figueiredo, T., Figueroa, A., Giménez, F., Gomes, H.M., Gonzalez-Y-Merchand, J.A., Macías, A., Milián-Suazo, F., Rodríguez, C.A., Santillán, M.A., Suffys, P.N., Trangoni, M.D., Zárraga, A.M., Cataldi, A., 2013. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. Research in Veterinary Science 94, 9-21.

Tabela 1. Perfis genéticos obtidos a partir de análise MIRU-VNTR de cinquenta e cinco isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de dezenove propriedades de quatro estados brasileiros. Perfil da cepa referência AN5

AMOSTRAS	MIRU 02 - 154	MIRU 04- ETR D - 580	MIRU 10 - 960	MIRU 16 - 1644	MIRU 20 - 2059	MIRU 23 - 2531	MIRU 24 - 2687	MIRU 26 - 2996	MIRU 27 - QUB-5 - 3007	MIRU 31 - ETR E - 3192	MIRU 39 - 4348	MIRU 40 - 802	VNTR 42/ 424	VNTR 43/ ETR C / 577	VNTR 1955	VNTR 2163b /QUB11b	ETR A - 2165	VNTR 46 - 2347	VNTR 47 - 2401	VNTR 48 - ETR B - 2461	VNTR 49 - 3171	VNTR 52 - VNTR 3690 - 3690	QUB - 26 - 4052	VNTR 53 - QUB 4156c - 4156	PERFIL GENÉTICO	PROPRIEDADE / ESTADO
AN5	2	3	2	3	2	4	2	4	3	3	2	2	2	5	2	3	6	3	4	5	2	2	5	1	-	-
1	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	3	3	2	5	0	a	A / MS
2	2	3	2	3	2	4	2	5	3	2	2	2	2	5	3	2	6	3	4	3	3	2	5	1	b	B / MS
3	2	3	2	3	2	4	2	5	3	NA	2	2	2	5	3	2	6	3	4	NA	3	2	NA	1	b	B / MS
4	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	3	3	2	5	1	c	C / ES
5	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	3	3	2	5	1	d	C / ES
6	2	3	2	3	2	4	2	4	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	3	3	2	5	0	e	C / ES
7	2	3	2	3	2	4	2	5	2	4	2	2	0	5	1	4	5	3	4	3	2	2	6	1	f	D / PE
8	2	3	2	2	2	4	2	4	3	3	2	2	2	5	3	5	4	3	4	5	3	2	4	1	g	E / MS
9	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	3	3	2	NA	1	c	C / ES
10	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
11	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
12	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	3	2	6	3	4	4	3	2	5	1	i	F / RS
13	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
14	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
15	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
16	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
17	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
18	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
19	2	3	2	3	2	4	2	5	3	1	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	j	F / RS
20	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
21	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	h	F / RS
22	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
23	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
24	2	3	2	3	2	4	2	5	3	1	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	j	F / RS
25	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	h	F / RS
26	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	h	F / RS
27	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	h	F / RS
28	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	5	3	4	4	3	2	5	1	k	G / MS
29	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	5	3	4	4	3	2	5	1	k	H / MS
30	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	3	6	3	4	5	3	2	5	1	l	I / MS
31	2	3	2	3	2	4	2	5	3	2	2	2	2	5	3	2	6	3	4	3	3	2	5	1	b	J / RS
32	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	2	3	2	5	1	m	K / RS
33	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	2	3	2	4	1	n	K / RS
34	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	2	3	2	4	1	n	K / RS
35	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	2	3	2	NA	1	m	K / RS
36	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	6	3	4	2	3	2	4	1	n	K / RS
37	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	4	0	o	L / RS
38	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	4	0	o	L / RS
39	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	1	3	3	2	6	3	4	4	3	2	4	1	p	M / MS
40	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	4	0	o	N / MS
41	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	3	3	4	4	3	2	4	1	q	O / MS
42	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	NA	1	r	O / MS
43	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	NA	1	r	O / MS
44	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	6	3	4	4	3	2	NA	1	r	O / MS
45	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	2	2	3	3	4	4	3	2	NA	1	q	O / MS
46	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	5	3	4	4	3	2	5	1	k	P / MS
47	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	5	3	4	4	3	2	5	1	k	Q / MS
48	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	NA	1	s	R / MS
49	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	NA	1	s	R / MS
50	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	NA	1	s	S / MS
51	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	5	1	s	S / MS
52	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	4	2	t	S / MS
53	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	4	2	t	S / MS
54	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	5	2	u	S / MS
55	2	3	2	2	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	4	7	3	4	5	3	2	5	2	u	S / MS

NA – Não Amplificado

Tabela 2: Distribuição e diversidade alélica dos loci MIRU-VNTR dos cinquenta e cinco isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de dezenove propriedades de quatro estados brasileiros e da cepa referência AN5

Locus	Número de isolados no alelo MIRU-VNTR									Diversidade alélica
	0	1	2	3	4	5	6	7	NA	
ETR B			22	8	14	11			1	0.7088
ETR A				19	1	5	23	8		0.6818
QUB - 26					11	29	1		15	0.4129
VNTR 1955		1	13	42						0.3721
VNTR 43 (ETR C)				14		42				0.3636
VNTR 2163b			44	2	9	1				0.3435
MIRU 16			10	38					8	0.3176
VNTR 53	5	47	4							0.2695
MIRU 31		2	2	50	1				1	0.1552
MIRU 26				3	53					0.0785
VNTR 42	1	1	54							0.0526
VNTR 49			2	54						0.0519
MIRU 27			1	55						0.0177
MIRU 02			56							- 0.018
MIRU 04				56						- 0.018
MIRU 10			56							- 0.018
MIRU 20			56							- 0.018
MIRU 23					56					- 0.018
MIRU 24			56							- 0.018
MIRU 39			56							- 0.018
MIRU 40			56							- 0.018
VNTR 46				56						- 0.018
VNTR 47					56					- 0.018
VNTR 52			56							- 0.018

Figura. Dendograma obtido por meio do aplicativo MIRU-VNTR*plus* dos cinquenta e cinco isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de dezenove propriedades de quatro estados brasileiros, além das cepas de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv. As cepas de *M. bovis* e *M. caprae* depositadas no aplicativo estão destacadas. Observam-se nos isolados analisados 22 perfis genéticos distintos, 13 perfis com mais de um cepa (agrupamentos) e nove isolados de perfil único. As letras maiúsculas A a S correspondem as propriedades. As siglas correspondem aos estados brasileiros (ES - Espirito Santo, MS - Mato Grosso do Sul, RS – Rio Grande do Sul e PE – Pernambuco)

ARTIGO 2

Perfis Genéticos de *Mycobacterium bovis* Isolados em Único Rebanho Bovino

A ser submetido à Acta Scientiae Veterinariae

Perfis Genéticos de *Mycobacterium bovis* Isolados em Único Rebanho Bovino*

Genetic Profiles of *Mycobacterium bovis* Isolates in an Unique Cattle Herd

Antonio Francisco de Souza-Filho[1], Ana Luiza Alves Rosa Osório[1], Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge[2], Flábio Ribeiro Araújo[1,3], Carlos Eugênio Soto Vidal[4], Cristina Pires Araújo[1], Letícia Alves Gomes Albertti[1] & Daniela de Oliveira Cazola[1]

*Artigo baseado em parte de dissertação apresentada pelo primeiro autor em cumprimento parcial dos requisitos para o curso de mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil.

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, FAMEZ-UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. [2]Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. [3]Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil. [4]Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil; Superintendência Federal da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Rio Grande do Sul (SFA-RS), Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondência: A.F. Souza-Filho [antoniosouzafilho@gmail.com – Tel +55 67 3345-3613] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller, 2443, Vila Ipiranga, CEP 79074-460, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

RESUMO

Introdução: *Mycobacterium bovis*, membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é o agente da tuberculose bovina, enfermidade endêmica, diagnosticada nos diversos estados brasileiros, por meio de testes tuberculínicos e inspeção de abate. Técnicas de tipagem

molecular ajudam a estratificar e refinar dados, fornecendo informações que facilitam as atividades epidemiológicas. Neste estudo utilizando a técnica MIRU-VNTR com 24 loci procurou-se caracterizar e identificar os agrupamentos genéticos de isolados de *Mycobacterium bovis* obtidos em um foco de tuberculose bovina.

***Materiais, Métodos & Resultados*:** Dezoito isolados de bacilos álcool-ácido resistentes foram obtidos, a partir do cultivo em meio de Stonebrink, de amostras de tecido de bovinos reagentes ao teste cervical comparativo. Após extração do DNA, por meio de termólise, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase, para amplificação da sequência alvo (RvD1-Rv2031c) que identifica espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Dezoito isolados identificados como espécies do complexo *M. tuberculosis* foram genotipados por meio da técnica MIRU-VNTR com 24 pares de iniciadores. O perfil genético, obtido após análise dos fragmentos em gel de agarose, foi utilizado na comparação do perfil de cada isolado, com cepas depositadas no banco de dados do aplicativo MIRU-VNTR*plus* e na geração do dendrograma pelo método UPGMA. Na comparação do perfil das 18 amostras estudadas, observou-se que a maioria (88,89%) apresentava perfil similar com cepas de *M. bovis* depositadas no aplicativo MIRU-VNTR*plus*. No dendograma foram observados três perfis genéticos distintos: o primeiro com 15 isolados, o segundo com dois isolados e um isolado de perfil único. Os iniciadores responsáveis por essa distinção foram o MIRU 31, que agrupou dois isolados em um perfil, e ETR A, B e C que discriminou o isolado de perfil único.

Discussão: A similaridade das cepas em estudo com cepas do aplicativo é sugestiva 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. Além disso, a similaridade encontrada na maioria das cepas de *M. bovis* pode se tratar de perfil típico da região. A presença de

diferentes genótipos de *M. bovis* no mesmo rebanho sugere circulação dos animais ou diferentes fontes de infecção intra-rebanho. Dois dos três perfis genéticos encontrados podem ser consequência da movimentação ativa entre rebanhos, pois dos 15 isolados pertencentes ao maior agrupamento, dois eram bovinos adquiridos de outras propriedades há três anos. Embora a entrada de animais na propriedade tivesse sido controlada por meio de teste tuberculínico, sabe-se que há bovinos que, mesmo infectados, não reagem à tuberculinização devido a imunossupressão. O isolado de perfil único não estabelece vínculo epidemiológico com as demais cepas, sugere doença proveniente de reativação de uma infecção latente. Deve-se avaliar também se a transmissão do agente infeccioso ocorre entre os animais silvestres e domésticos ou por meio de uma fonte de infecção comum a ambos. É essencial recorrer a abordagens integradas dos dados da epidemiologia convencional com técnicas de genotipagem para estabelecer ou não conexões epidemiológicas entre isolados de *M. bovis* de diversos mamíferos. A aplicação da técnica de epidemiologia molecular MIRU-VNTR em isolados de *M. bovis*, obtidos a partir de um foco de tuberculose bovina no estado do RS, demonstrou que há diversidade genética entre as cepas em circulação, embora exista um agrupamento predominante.

Descritores: diversidade genética, tuberculose bovina, MIRU-VNTR.

INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis, membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é o agente da tuberculose bovina, enfermidade endêmica, diagnosticada nos diversos estados brasileiros, por meio de testes tuberculínicos e inspeção de abate. Esse agente tem amplo espectro de patogenicidade para as espécies silvestres e domésticas, principalmente bovinos e bubalinos [4, 20]. Além dos prejuízos ao comércio nacional e internacional, seu caráter zoonótico a caracteriza como um problema de saúde pública [31].

Técnicas de tipagem molecular ajudam a estratificar e refinar dados, fornecendo informações que facilitam as atividades epidemiológicas, incluindo a vigilância de doenças, investigações de surtos, identificando padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente díspares [12], bem como revelar focos provocados por mais de uma cepa [30].

O método de tipagem discriminatório denominado MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) é um sistema rápido e reprodutível, onde ocorre a geração de genótipos baseados no estudo de loci contendo VNTRs (Número Variável de Repetições em Sequência) do complexo *M. tuberculosis* [21]. Assim, MIRU-VNTR compara as cepas de áreas geográficas diferentes possibilitando o rastreamento da movimentação de linhagens. Este tipo de abordagem permite a análise de grande número de cepas e a identificação de focos de contaminação dentro da população [15, 19, 20], proporcionando condições para interrupção da transmissão da doença.

Neste estudo utilizando a técnica MIRU-VNTR com 24 loci procurou-se caracterizar e identificar os agrupamentos genéticos de isolados de *Mycobacterium bovis* obtidos em um foco de tuberculose bovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram obtidas de uma propriedade de 200 hectares ao sudeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, destinada à pecuária leiteira, onde eram criados aproximadamente 200 bovinos da raça Holandesa.

No ano de 2011, 178 bovinos foram submetidos ao teste cervical comparativo (TCC), seguindo as orientações do manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [4]. Trinta e cinco bovinos reagentes ao teste foram levados para abate sanitário em matadouro frigorífico. Durante o abate, foram colhidas amostras de órgãos para realização do exame bacteriológico em meio de Stonebrink. Vinte amostras que

apresentaram isolados característicos de *M. bovis* foram confirmadas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) quando corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. O DNA genômico dessas amostras foi extraído por meio de termólise [18] e utilizados para amplificação das sequências alvo (RvD1-Rv2031c) a partir dos iniciadores JB21 e JB22 [25].

Dezoito amostras identificadas como espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a cepa referência de *M. bovis* AN5 foram genotipadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com 24 pares de iniciadores [28,29]. Em cada reação foram utilizados 6,4 µl de *Go Taq Green Master Mix* 1x[1], 0,3 pmol de cada iniciador, 100 ηg de DNA e água livre de nucleases suficiente para o volume final de 18 µl. Amostra de *M. tuberculosis* estirpe H37Rv e água livre de nucleases foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente.

A amplificação foi realizada em termociclador MJ *Mini Personal Thermal Cycler*[2], conforme Supply [28]. Os produtos amplificados de tamanhos variáveis foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% e solução tampão TBE 1x (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) a uma voltagem de 120 volts, 400 mÅ durante 300 minutos, em migração paralela ao padrão de 100 pares de bases.

Terminada a migração o gel foi mergulhado em uma solução de TBE 1x e corante *Sybr Gold*[3] na proporção 1 : 50.000. Depois de 40 minutos de coloração o gel foi colocado no sistema de fotodocumentação *Gel Doc* XR[2] e as imagens das bandas capturadas por meio do software *Quantity One*[2]. Depois de corado e fotodocumentado, determinou-se o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, de todas as amostras para cada locus.

A quantidade de alelos foi determinada de acordo com a tabela publicada por Supply [28] que relaciona o tamanho do fragmento obtido com a quantidade de cópias de cada alelo. Baseado na quantidade de alelos, cada amostra recebeu um código numérico que foi usado para descrever seu perfil genético. O teste foi considerado válido quando o resultado do

controle positivo era correspondente ao obtido por Supply [28]. O perfil genético foi utilizado na comparação do perfil de cada isolado, com cepas depositadas no banco de dados do aplicativo MIRU-VNTR*plus* (http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index). Foi utilizado o ponto de corte de 0,17 (padrão do aplicativo), que corresponde a uma tolerância de até quatro loci de diferença, para analisar a similaridade entre a cepa em estudo e as cepas depositadas no aplicativo.

O perfil genético dos isolados em estudo, *M. bovis* AN5 e das cepas de *M. bovis* 1601/01, 4258/00, 53.46/02, 9564/00, 8217/02, 1290/00, 7540/01, *M. caprae* 8986/99 e *M. tuberculosis* H37Rv, depositadas no aplicativo, foi utilizado na geração do dendrograma pelo método UPGMA.

RESULTADOS

O perfil genético de cada isolado obtido a partir de análise MIRU-VNTR de um foco de tuberculose bovina no RS, Brasil pode ser visualizado na Tabela 1.

Na comparação do perfil das 18 amostras estudadas observou-se que a maioria (88,89%) apresenta perfil similar com cepas de *M. bovis* depositadas no aplicativo MIRU-VNTR*plus*.

No dendrograma (Figura 1) observam-se três perfis genéticos distintos: o primeiro com 15 isolados, o segundo com dois isolados e um isolado de perfil único. Os iniciadores responsáveis por essa distinção foram o MIRU 31, que agrupou dois isolados em um perfil, e ETR A, B e C que discriminou o isolado de perfil único.

Cinco amostras não amplificaram em alguns loci, mesmo depois de repetidas tentativas, são elas: amostras 12, 16 e 17, locus MIRU 16; amostras 10, 11, 15, 16 e 17, locus QUB - 26 - 4052.

DISCUSSÃO

O estudo da diversidade genética de cepas *de M. bovis* por meio da técnica MIRU-VNTR com 24 iniciadores evidenciou três perfis genéticos, embora a maioria das cepas seja genotipicamente similar. Essa similaridade é sugestiva 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 [7, 10, 32]. Além disso, a similaridade encontrada na maioria das cepas de *M. bovis* pode se tratar de perfil típico da região [23]. O isolado de perfil único, não estabelece vínculo epidemiológico com as demais cepas, sugere doença proveniente de reativação de uma infecção latente [10, 13, 32].

A presença de diferentes genótipos de *M. bovis* no mesmo rebanho sugere circulação dos animais [23] ou diferentes fontes de infecção intra-rebanho [26]. Dois dos três perfis genéticos encontrados pode ser consequência da movimentação ativa entre rebanhos, pois dos 15 isolados pertencentes ao maior agrupamento, dois eram bovinos adquiridos de outras propriedades há três anos. Embora a entrada de animais na propriedade tivesse sido controlada por meio de TCC, sabe-se que há bovinos que, mesmo infectados, não reagem à tuberculinização devido a imunossupressão [20].

A possibilidade de animais silvestres albergarem cepas de *M. bovis* comuns às espécies domésticas, funcionando como potenciais reservatórios responsáveis pela introdução ou reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose tem sido tema amplamente debatido em vários países [6,9]. Zumárraga *et al*. [33] genotiparam nove isolados *de M. bovis* de animais silvestres provenientes da Argentina e observaram que dois dos espoligotipos eram mais encontrados nos bovinos do Brasil.

Pesquisas em animais silvestres de vida livre no Brasil não relataram qualquer referência à presença de *M. bovis*, exceto, no Rio Grande do Sul, numa espécie de suíno

selvagem criado em cativeiro, cateto (*Tayassu tajacu*) [17]. O uso de marcadores epidemiológicos, como *spoligotyping* e MIRU, demonstrou que javalis (*Sus scrofa*) e bovinos partilham as mesmas estirpes de *M. bovis* quando coabitam as mesmas regiões [3, 16, 21]. O javali foi introduzido em criações na Argentina e Uruguai, de onde ingressou no Rio Grande do Sul e progressivamente avança [8]. Já em outros países como Reino Unido, Nova Zelândia, África do Sul, Irlanda e Austrália vários animais silvestres de vida livre, texugo, cervídeos e porcos selvagens são considerados reservatórios do referido agente [15].

Deve-se avaliar também se a transmissão do agente infeccioso ocorre entre os animais silvestres e domésticos ou por meio de uma fonte de infecção comum a ambos [1]. É essencial recorrer a abordagens integradas dos dados da epidemiologia convencional com técnicas de genotipagem para estabelecer ou não conexões epidemiológicas entre isolados de *M. bovis* de diversos mamíferos.

A similaridade encontrada entre as cepas em estudo e aquelas de outros continentes, depositadas no aplicativo, pode ser explicada pelo fato de que os membros do complexo *M. tuberculosis* têm evolução clonal [27]. A técnica de MIRU-VNTR além de ser uma ferramenta útil para estudos de agrupamento genéticos pode ser indicada para estudos filogenéticos das cepas de *M. bovis* [14]. Para inferir relações filogenéticas profundas usando MIRU-VNTR, pelo menos 24 loci devem ser utilizados para minimizar o erro de homoplasia [5], além de amostragem representativa.

Em outro estudo utilizando MIRU-VNTR em cepas isoladas de uma propriedade no estado do Rio de Janeiro, Figueiredo *et al*. [11] observaram que os loci de MIRU 4, 26 e 40, bem como ETR (A, B, C) foram capazes de distinguir as cepas estudadas, coincidindo assim com o resultado do presente estudo, os loci ETR (A, B, C) permitiram discriminar o isolado de perfil único. O MIRU 31, responsável pela discriminação do grupo com dois isolados, também já foi citado como capaz de distinguir cepas devido a variação na quantidade de

alelos [22] embora esse locus seja considerado como de baixo poder discriminatório por outros pesquisadores [11,24].

A não amplificação em alguns loci, mesmo depois de repetidas tentativas, pode ter ocorrido devido a mutações ou degradação do DNA, que impediram o anelamento dos iniciadores, levando a não amplificação dessas regiões genômicas. Esses problemas podem ser elucidados por meio de sequenciamento, que poderá mostrar variações na sequência dos loci. Segundo Supply *et al*. [29], nestes casos os genótipos ainda podem ser comparados de forma confiável com base na caracterização dos demais loci, principalmente devido a análise de similaridade tolerar diferença de até 4 loci em comparação com as cepas depositadas.

O presente estudo oferece a primeira percepção sobre agrupamentos genéticos de isolados de *M. bovis* em bovinos tuberculosos no Rio Grande do Sul. Esses dados serão importantes para traçar as relações entre as cepas a medida que estudos adicionais sejam realizados, e assim contribuir para o entendimento da epidemiologia da tuberculose na região e avançar no controle proposto pelo PNCEBT.

CONCLUSÃO

A aplicação da técnica de epidemiologia molecular MIRU-VNTR em isolados de *M. bovis*, obtidos a partir de um foco de tuberculose bovina no estado do RS, demonstrou que há diversidade genética entre as cepas em circulação, embora exista um agrupamento predominante.

FONTES E FABRICANTES

[1]*Go Taq Green Master Mix* 2x, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA.

[2] Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA.

[3]SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, Molecular Probes Incorporated, Eugene, Oregon, USA.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Adolfo Carlos Barreto Santos pelas contribuições no trabalho e Dra. Eunice Atsuko Totumi Cunha por fornecer amostras de cepas padrão.

FINANCIEMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 505837/2008-0 e 479394/2011-3); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT - 23/200.024/2009 e 23/200.582/2012), Embrapa Gado de Corte (03.11.22.003.00.00)

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses

REFERÊNCIAS

1 **Abrahão R.M.C.M. 1998.** Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. 318f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

2 **Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P. & Fauville-Dufaux M. 2006.** Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS*6110* restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(6): 1951-1962.

3 **Aranaz A., de Juan L., Montero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Álvarez J., Romero B., Bezos J.,Vela A.I., Briones V., Mateos A. & Domínguez L. 2004.** Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(6): 2602-2608.

4 **Brasil. 2006.** 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, 184p.

5 **Comas I., Homolka S., Niemann N. & Gagneux S. 2009.** Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *Plos One*. 4(11): 1-11.

6 **Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., de Kantor I. & Meslin F.X. 1998.** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*. 4(1): 59-70.

7 **Dale J.W., Nor R.M., Ramayah S., Tang T.H. & Zainuddin Z.F. 1999.** Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(5): 1265-1268.

8 **Deberdt A.J. & Scherer S.B. 2007.** O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Natureza e Conservação*. 5(2): 31-44.

9 **Duarte E.L., Domingos M., Albuquerque T., Amado A. & Botelho A. 2007.** Bovine tuberculosis transmission between domestic and feral species in Portugal: first molecular evidences in *Mycobacterium bovis* isolates from a farm in Alentejo. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias*. 102(563-564): 299-303.

10 **Ferrazoli L., Palaci M., Marques L.R., Jamal L.F., Afiune J.B., Chimara E., Martins M.C., Silva-Telles M.A., Oliveira C.A., Palhares M.C., Spada D.T. & Riley L.W.**

2000. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 4(1): 18-25.

11 **Figueiredo E.E., Ramos D.F., Medeiros L., Silvestre F.G., Lilenbaum W., Silva J.T., Paschoalin V.M. & Dellagostin O.A. 2012**. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. *The Veterinary Journal.* 193(1): 296-298.

12 **Foxman, B. & Riley, L. 2001.** Molecular epidemiology: focus on infection. *American Journal of Epidemiology***.** 153(12): 1135-1141.

13 **García de Viedma D., Mokrousov I. & Rastogi N. 2011**. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(Suppl 1): 8-13.

14 **Gibson A., Brown T., Baker L. & Drobniewski F. 2005.** Can 15-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis provide insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*? *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8207-8213.

15 **Gortazar C., Vicente J., Boadella M., Ballesteros C., Galindo R.C., Garrido J., Aranaz A. & de la Fuente J. 2011.** Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology.* 151(1-2): 170-178.

16 **Hermoso de Mendoza J., Parra A., Tato A., Alonso J.M., Rey J.M., Peña J., García-Sánchez A., Larrasa J., Teixidó J., Manzano G., Cerrato R., Pereira G., Fernández-Llario P. & Hermoso de Mendoza M. 2006.** Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive Veterinary Medicine.* 74(2-3): 239-247.

17 **Mayer F.Q., Cerva C., Driemeier D., da Cruz C.E., Loiko M.R., Coppola M.M, Cibulski S. & Bertagnolli A.C. 2012.** *Mycobacterium bovis* infection in a collared

peccary (*Tayassu tajacu*): insights on tuberculosis wild reservoirs. Veterinary Microbiology. 160(3-4): 549-551 [Letter].

18 **Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C. & Supply P. 2001.** 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.* 98(4): 1901-1906.

19 **McLernon J., Costello E., Flynn O., Madigan G. & Ryan F. 2010.** 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*. 48(12): 4541–4545.

20 **World Organisation for Animal Health. 2009.** Bovine Tuberculosis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris. 5th. Paris. OIE, pp. 1-16.

21 **Parra A., Fernández-Llario P., Tato A., Larrasa J., García A., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza M. & Hermoso de Mendoza J. 2003.** Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology*. 97(1-2): 123-133.

22 **Parreiras P.M., Andrade G.I., Nascimento T.F., Oelemann M.C., Gomes H.M., Alencar A.P., Assis R.A., Mota P.M., Pereira M.A., Lobato F.C., Lage A.P. & Suffys P.N. 2012**. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cru*. 107(1): 64-73.

23 **Perumaalla V.S., Adams L.G., Payeur J.B., Jarnagin J.L., Baca D.R., Suárez-Güemes F. & Ficht T.A. 1996.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(9): 2066–2071.

24 **Rocha V.C., de Figueiredo S.C., Rosales C.A., Grisi-Filho J.H.H, Keid L.B., Soares R.M. & Ferreira Neto J.S. 2013.** Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 13(1): 17-21.

25 **Rodriguez J.G., Mejia G.A., Del Portillo P., Patarroyo M.E. & Murillo L.A. 1995.** Species-Specific Identification of *Mycobacterium-bovis* by PCR. *Microbiology*. 141(9): 2131-2138.

26 **Salamon H., Behr M.A., Rhee J.T. & Small P.M. 2000.** Genetic distances for the study of infectious disease epidemiology. *American Journal of Epidemiology*. 151 (3): 324-334.

27 **Smith N.H., Gordon S.V., de la Rua-Domenech R., Clifton-Hadley R.S. & Hewinson R.G. 2006.** Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiology*. 4(9): 670-681.

28 **Supply, P. 2005 .** Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Lille. Technical Guide. Lille (Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille)**.** 73p.

29 **Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C. & van Soolingen D. 2006.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(12): 4498-4510.

30 **Tenover F.C., Arbeit R.D. & Goering R.V. 1997.** How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for

Healthcare Epidemiology of America. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 18(6): 426-439.

31 **Valente L.C.M., Vale S.M.L.R. & Braga M.J. 2011.** Determinantes do Uso de Medidas Sanitárias de Controle da Brucelose e Tuberculose Bovina. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. 49(1): 215-232.

32 **van Soolingen, D. 2001.** Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*. 249(1): 1-26.

33 **Zumárraga M.J., Arriaga C., Barandiaran S., Cobos-Marín L., de Waard J., Estrada-Garcia I., Figueiredo T., Figueroa A, Giménez F., Gomes H.M., Gonzalez-Y-Merchand J.A., Macías A., Milián-Suazo F., Rodríguez C.A., Santillán M.A., Suffys P.N., Trangoni M.D., Zárraga A.M. & Cataldi A. 2013.** Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. *Research in Veterinary Science*. 94(1):9-21.

Tabela 1. Perfis de *Mycobacterium bovis* obtidos a partir de análise MIRU-VNTR de um foco de tuberculose bovina no RS, Brasil

BOVINO	MIRU 02 - 154	MIRU 04- ETR D - 580	MIRU 10 - 960	MIRU 16 - 1644	MIRU 20 - 2059	MIRU 23 - 2531	MIRU 24 – 2687	MIRU 26 - 2996	MIRU 27 - QUB-5 - 3007	MIRU 31 - ETR E - 3192	MIRU 39 - 4348	MIRU 40 - 802	VNTR 42/ 424	VNTR 43/ ETR C / 577	VNTR 1955	VNTR 2163b /QUB11b	ETR A - 2165	VNTR 46 - 2347	VNTR 47 - 2401	VNTR 48 - ETR B - 2461	VNTR 49 - 3171	VNTR 52 - VNTR 3690 - 3690	QUB - 26 - 4052	VNTR 53 - QUB 4156c - 4156	GRUPO GENÉTICO
AN5	2	3	2	3	2	4	2	4	3	3	2	2	2	5	2	3	6	3	4	5	2	2	5	1	-
*1	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
2	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
3	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	3	3	2	6	3	4	4	3	2	5	1	c
4	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
5	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
6	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
7	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
8	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
9	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
10	2	3	2	3	2	4	2	5	3	1	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	b
11	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
12	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	a
13	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
14	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a
15	2	3	2	3	2	4	2	5	3	1	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	b
16	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	a
17	2	3	2	NA	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	NA	1	a
*18	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	2	5	3	2	3	3	4	2	3	2	5	1	a

* bovinos adquiridos de outras propriedades três anos antes do rebanho ser submetido ao teste cervical comparativo

NA – Não amplificado

Figura 1. Dendograma obtido por meio do aplicativo MIRU-VNTR*plus* dos dezoito isolados de *Mycobacterium bovis*, de um foco de tuberculose bovina no RS, além das cepas de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv. As cepas de *M. bovis* e *M. caprae* depositadas no aplicativo estão destacadas. Observam-se nos isolados analisados três perfis genéticos distintos: o primeiro com 15 isolados, o segundo com dois isolados e um isolado de perfil único. A sigla RS corresponde ao estado brasileiro do Rio Grande do Sul

*bovinos adquiridos de outras propriedades três anos antes do rebanho ser submetido ao teste cervical comparativo