

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação de Marcadores Genéticos para Tipagem de *Mycobacterium bovis***

**Telma de Figueirêdo do Nascimento**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**Avaliação de Marcadores Genéticos para Tipagem de *Mycobacterium bovis***

**Telma de Figueirêdo do Nascimento**

*Orientação*

**Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Teixeira de Jesus**

*Co-orientação*

**Dr. Philip Noel Suffys**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Veterinária, no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Novembro de 2008

636.20896995

N244a

T

Nascimento, Telma de Figueirêdo do, 1981-  
Avaliação de marcadores genéticos para  
tipagem de Mycobacterium Bovis / Telma de  
Figueirêdo do Nascimento - 2008.

40 f.: il.

Orientador: Vera Lúcia Teixeira de Jesus.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

Bibliografia: f. 24-28.

1. Mycobacterium bovis - Teses. 2.  
Tuberculose em bovino - Teses. 3. Bovino -  
Doenças - Brasil - Teses. I. Jesus, Vera  
Lúcia Teixeira de, 1959-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.  
III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

TELMA DE FIGUEIRÊDO DO NASCIMENTO

Dissertação submetida como requisito parcial par a obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós Graduação em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 19/11/2008

*Vera Lucia Teixeira de Jesus*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Vera Lucia Teixeira de Jesus. Dra., UFRRJ/RJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Andrey Pereira Lage Dr., UFMG/MG

*Ângela de Oliveira*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Ângela de Oliveira Dra, UFRRJ/RJ

"Quando sabemos de onde viemos é fácil discernir a que lugar  
queremos chegar"

## **Dedicatória**

**A Deus**

*Autor de toda vida*

**À memória de meu pai Gilberto**

*Que deixa muitas saudades*

**A minha mãe Lourdes**

*Toda sua dedicação e incentivo*

**Ao meu marido Marcelo**

*Sempre amoroso e compreensivo*

**A todos os meus amigos**

*Que me acompanharam e apoiaram durante todos esses anos.*

## Agradecimentos Especiais

### **Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Teixeira de Jesus**

*Por sua dedicação como orientadora, amizade, incentivo e confiança em meu trabalho e por sua valiosa contribuição científica, que muita me ajudou.*

### **Dr. Phillip Noel Suffys**

*Por ter me confiado esse trabalho, sua orientação, confiança e incentivo mesmo nos momentos mais difíceis deste projeto.*

## **Agradecimentos**

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As amigas de laboratório Atiná, Lia, Márcia Aparecida e Milena pela amizade, companheirismo e as mais diversas formas de contribuição durante este trabalho.

Aos funcionários do LANARA-MG, principalmente Andréa Padilha Alencar, colaboradores essenciais na execução deste trabalho.

Aos veterinários e outros funcionários dos SIFs e abatedouros, que sem sua colaboração não seria possível a realização desse trabalho.

A Patrícia Martins Parreira pelo início desse projeto e ter me convidado participar dele.

Aos Drs. Harrison Magdinier Gomes e Maraníbia A.C.Oelemann por compartilharem comigo sua experiência profissional.

A professora Glória Direito por ter me recebido na Universidade e apoiado meu projeto.

A instituição FIOCRUZ que investiu muito na elaboração deste trabalho.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este estudo.

Aos que sempre torceram por mim e que não estão listados aqui, e também aos que me influenciaram positivamente ao longo da minha vida e que estão felizes por mais esta etapa concluída.



## RESUMO

Nascimento, Telma de Figueirêdo. **Avaliação de Marcadores genéticos para a tipificação de *Mycobacterium bovis***. 2008. 40p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

No Brasil acredita-se que a tuberculose bovina está presente em todos os Estados, assim como está em todos os continentes. Os índices oficiais estão em 1,3% do rebanho nacional infectado, que representaria um número elevado, na ordem de 2,5 milhões de animais. *Mycobacterium bovis* destaca-se como zoonose de reconhecida importância. Crescentes são as perdas econômicas, causada pela tuberculose em bovinos, como a baixa na produtividade do rebanho, condenação de carcaças em matadouros, redução na produção de leite e carne, comprometimento da comercialização de animais e seus produtos no mercado interno e externo. Estima-se que em torno de 5,0% da tuberculose humana é causada por *M. bovis*. O sucesso de um programa de controle de uma doença está estreitamente ligado a diferentes fatores entre os quais o conhecimento da história do agente etiológico e sua distribuição espacial e temporal. Os métodos moleculares são utilizados como ferramentas auxiliares no combate à doença fornecendo informações com a finalidade de alcançar estes objetivos. Na última década, métodos para tipagem molecular de *Mycobacterium tuberculosis* foram desenvolvidos e aplicados em larga escala. Embora o genoma dos dois parasitos seja muito parecido, o poder discriminatório dos métodos decresce para *Mycobacterium bovis*. Neste trabalho foram analisadas amostras de bovinos abatidos em Frigoríficos sob Inspeção Federal no estado de Minas Gerais. Um total de 215 culturas foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, e apenas 159 confirmaram um perfil de *Mycobacterium bovis* através das técnicas moleculares de Spoligotyping e 159 a técnica do MIRU-VNTR. A mesorregião Sul e Sudoeste mostraram a maior prevalência da doença nas amostras estudadas. O método de Spoligotyping aplicados às amostras mostrou a presença de 32 perfis diferentes, obtendo um HGDI de 0,86 e em contra partida o MIRU-VNTR apresentou 40 perfis diferentes com um HGDI de 0,87. Neste estudo foi possível avaliar que quando utilizamos estas técnicas em conjunto obtemos um maior poder discriminatório entre essas cepas.

**Palavras-chave:** tuberculose, tipagem molecular, spoligotyping, MIRU-VNTR, bovino.

## ABSTRACT

Nascimento, Telma de Figueirêdo. **Evaluation of genetic markers for the characterization of *Mycobacterium bovis***. 2008. 38p Dissertation (Masters in Veterinary Microbiology). Institute of Veterinary, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

In Brazil it is believed that bovine tuberculosis is present in all states, as is in all continents. The official indices are 1.3% of the national herd infected, which represent a large number in the order of 2.5 million animals. *Mycobacterium bovis* stands out as zoonotic disease of major importance. Increasing are the economic losses, caused by tuberculosis in cattle, such as low productivity of the herd, condemnation of carcasses at slaughterhouses, reduction in the production of milk and meat, commitment marketing of animals and their products domestically and externally. It is estimated that about 5,0 % of human tuberculosis is caused by *Mycobacterium bovis*. The success of a program to control a disease is closely linked to various factors including the knowledge of the history of the causative agent and its spatial and temporal distribution. Molecular methods are used as auxiliary tools in combating the disease by providing information in order to achieve these goals. In the last decade, methods for molecular typing of *M. tuberculosis* were developed and implemented on a large scale. Although the genomes of the two parasites are very similar, the discriminatory power of the methods is smaller in *Mycobacterium bovis*. In this study were analyzed samples from cattle slaughtered in refrigerators under Federal Inspection in the state of Minas Gerais. A total of 215 cultures sent to the Laboratory of Applied Molecular biology to Micobacterioses, and only 159 confirmed a profile of *Mycobacterium bovis* through molecular techniques applied. The south and state has the highest prevalence of the disease in the samples studied. The method of Spoligotyping applied to the samples showed the presence of 32 different profiles, obtaining a HGDI of 0.86 and a departure from the MIRU-VNTR presented 40 different profiles with a HGDI of 0.87. In this study was to evaluate that when using these techniques together we get a greater discriminatory power between these strains.

**Keywords:** tuberculosis, molecular typing, spoligotyping, MIRU-VNTR, bovine.

## LISTA DE TABELAS

		<b>Pg.</b>
Tabela 1	Lista de primers MIRU-VNTR de <i>Mycobacterium bovis</i>	11
Tabela 2	Distribuição das amostras enviadas pelo LANAGRO/MG, no período de 2002 a 2004, para o Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacteriose, FIOCRUZ/RJ	14
Tabela 3	Perfis de <i>Spoligotyping</i> das 159 amostras de <i>M. bovis</i> , com número de isolados segundo banco de dados ( <a href="http://www.Mbovis.org">www.Mbovis.org</a> ), das amostras enviadas do LANAGRO/MG, no período de 2002 a 2004	15
Tabela 4	Perfis de MIRU-VNTR com o número de amostras correspondentes	17
Tabela 5	Diversidade alélica do MIRU-VNTR	18
Tabela 6	Distribuição das amostras isoladas de <i>M. bovis</i> por <i>Spoligotyping</i> pelas mesorregiões de MG	18
Tabela 7	Principais espoligotipos de <i>M. bovis</i> distribuídos pelas mesorregiões de MG	<b>19</b>

## LISTA DE FIGURA

Figura 1	Técnicas moleculares utilizadas no Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>Pg.</b> 6
----------	---	-----------------

## LISTA DE QUADRO

Quadro1	Mesorregiões e Microrregiões Geográficas do Estado de Minas Gerais, segundo IBGE	<b>Pg.</b> 13
---------	--	------------------

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

BAAR – Bacilos lcool cido Resistentes  
BCG – Bacilo Calmette e Guérin  
CTAB – Hexadecyl Trimethyl-ammonium Bromide  
DIF – Departamento de Inspeo Federal  
DNA – cido Desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxiribonucleotdeos  
DR – Direct Repeat  
EDTA – cido etilenodiamino tetra-acético  
ETR – Exact Tandem Repeat  
GM – Agrupamento do MIRU  
GS – Agrupamento do Spoligotyping  
HCl – cido Clorídrico  
HGDI – Hunter-Gaston Discriminative Index  
LARA – Laboratório Regional de Apoio Animal  
LJ – Lwenstein-Jensen  
MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MgCl – Cloreto de Magnésio  
MIRU - Mycobacterial Interspersioned Repetitive Units  
mM – Milimolar  
NaCl – Cloreto de Sódio  
C – Graus Celcius  
pb – pares de bases  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
pH – Concentrao de Hidrognio Inico  
PNCEBT - Plano Nacional de Controle e Erradicao da Brucelose e Tuberculose  
PPD – Produto Proteico Derivado  
PVC – Poli Cloreto de Vinila  
QUB – Queen’s University Belfast  
SDS – Sodium Dodecyl Sulphate  
Taq – Thermus aquaticus  
TBE – Tris-cido Bórico-EDTA  
TCC – Teste Cervical Comparativo  
TCS – Teste Cervical Simples  
TE – Tampão Tris-EDTA  
TPC – Teste da Prega Caudal  
VNTR - Variable Number Tandem Repeats

## SUMÁRIO

	<b>Pag.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 O agente	3
2.2 Epidemiologia	3
2.3 Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose	4
2.4 Diagnóstico	4
2.5 Técnicas Moleculares	6
2.5.1 Spoligotyping	7
2.5.2 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)	7
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	9
3.1 Local de realização do trabalho	9
3.2 Amostras	9
3.3 Tipificação por métodos moleculares	10
3.3.1 Extração de DNA	10
3.3.2 Spoligotyping	10
3.3.3 VNTRs	11
3.3.4 Análise dos Spoligotyping x VNTRs	12
3.3.5 Cálculo da diversidade alélica	12
3.3.6 Cálculo do Índice Hunter-Gaston de Discriminação (HGI)	12
3.4 Distribuição dos espoligotipos isolados pelas mesorregiões do Estado de MG	12
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	14
4.1 Amostras	14
4.2 Spoligotyping	14
4.3 MIRU-VNTR	17
4.4 Diversidade Alélica	17
4.5 Distribuição dos espoligotipos pelas mesorregiões do Estado de MG	18
<b>5 CONCLUSÕES</b>	20
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	21
<b>ANEXOS</b>	26
<b>A Soluções e Reagentes</b>	26
<b>B Distribuição dos perfis de Spoligotyping e MIRU-VNTR nas regiões estudadas</b>	27

# 1 INTRODUÇÃO

No passado a tuberculose bovina era considerada como o maior problema em saúde pública por sua transmissão ao homem através do leite de vacas infectadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), a tuberculose como zoonose é preocupante, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o conhecimento do problema é escasso. Assim, são necessárias melhorias nos aspectos de saúde pública veterinária em relação à infecção por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), especialmente nas populações de risco. Grupos ocupacionais, como magarefes e tratadores de animais são os principalmente afetados, assim como médico-veterinários e trabalhadores de frigoríficos que mantêm um contato direto com o animal. Dados sobre *M. bovis* em humanos em países em desenvolvimento são escassos e este fato ocorre principalmente devido ao método de eleição para diagnóstico da tuberculose em humanos representado pela baciloscopia do escarro.

Crescentes são as perdas econômicas devidas à tuberculose bovina como baixa na produtividade do rebanho, condenação de carcaças em matadouros, redução na produção de leite e carne, comprometimento da comercialização de animais e seus produtos no mercado interno e externo. Além disso, existem perdas de difícil quantificação e decorrentes da simples presença da doença, representadas pelo menor valor dos animais vivos infectados e dificuldade para vendê-los, perda de reprodutores valiosos, perda de mercados potenciais, custos do tratamento dos seres humanos infectados, bem como das horas de trabalho que esses indivíduos deixam de realizar em decorrência da instalação da doença.

Os animais infectados são as principais fontes de infecção, sendo a via oro-faríngea a porta de entrada mais comum e com capacidade transmitir a doença a outros, mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais. O agente pode ser eliminado pela respiração, pelo corrimento nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas e pelo sêmen. A ingestão de leite contaminado é a principal via de transmissão para animais jovens e também o homem. A transmissão transplacentária é considerada muito rara nos bovinos e as vias de transmissão menos comum são a intra-uterina e o coito, através de sêmen contaminado.

No Brasil, os programas de controle da tuberculose bovina não são realizados adequadamente e acredita-se que a doença se encontre disseminada por todo o país, sendo sua incidência variável de acordo com o sistema de exploração animal. Um método de se avaliar a prevalência da tuberculose bovina através de um inquérito epidemiológico em matadouros, procurando, a partir das carcaças e vísceras enviadas ao Departamento de Inspeção Final (DIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/MAPA (BRASIL, 2001) e identificar alterações anátomo-patológicas características. Um dos benefícios dos programas de controle da tuberculose bovina, além de dirimir as perdas econômicas e os entraves para o comércio exterior de animais e seus produtos, é a prevenção da doença na população humana.

Surtos epidêmicos de tuberculose causados por mais de um tipo de *M. bovis* sugerem múltiplas fontes de infecção, possivelmente por causa da compra de animais infectados de outras propriedades, ou infecção simultânea de rebanhos vizinhos. A freqüente movimentação de animais entre fazendas, em uma pequena região geográfica e a transmissão entre bovinos é reconhecida também como altamente significativa na manutenção da doença na população bovina.

A epidemiologia molecular da tuberculose humana no Brasil tem contribuído para melhorar a compreensão dos fatores de risco associados à transmissão da doença assim como tem possibilitado a monitoração do impacto dos programas de controle da tuberculose em hospitais e na comunidade.

Este trabalho visa auxiliar no estabelecimento da epidemiologia dos perfis moleculares de *M. bovis* no Estado de Minas Gerais, estabelecendo uma relação filogenética e biogeográfica das

amostras analisadas, e avaliar a viabilidade das técnicas moleculares Spoligotyping e Variable Number Tandem Repeat (VNTR) para tipificar amostras de *M. bovis* obtidas a campo.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Agente

As bactérias do gênero *Mycobacterium* pertencem à família Mycobacteriaceae e à ordem *Actinomycetales*. Estão amplamente distribuídas na natureza com um espectro variável, desde habitantes naturais de água e solo, até agentes patogênicos obrigatórios (KOX, 1995).

As micobactérias são aeróbias, bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), gram-positivas e não formam esporos. Uma característica importante do gênero é a presença de parede celular espessa, hidrofóbica e rica em lipídeos, ácido micólico e micolatos (HEIFETS, 2004).

As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas em um complexo denominado *Complexo Mycobacterium tuberculosis*. Esse complexo é formado por sete espécies relacionadas, sendo elas, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* e *M. tuberculosis*. Estas espécies compartilham 85,0 a 100% de identidade em DNA, possuindo seqüências altamente conservadas, mas diferindo nos seus hospedeiros, assim como na sua distribuição geográfica e na sua patogenicidade. O complexo *M. tuberculosis* compreende um grupo de microrganismos de crescimento lento com 20 a 24 horas para divisão celular. Além disso, o *M. tuberculosis* é capaz de persistir de forma latente nas células e granulomas por anos e pode ser reativada causando doença após décadas (HEIFETS, 2004).

Muitos estudos foram feitos no século XIX afim de se entender a dinâmica deste agente. No período entre 1885 e 1889, Robert Koch e seus colaboradores desenvolveram a tuberculina coma função de transferência de imunidade com o objetivo de tratar a doença. A tuberculina não modificou a evolução natural da doença. Em 1910, Mantoux introduziu o teste tuberculínico subcutâneo, e Calmette; Guérin desenvolveram o bacilo bovino atenuado (BCG) no Instituto Pasteur, na época da Primeira Guerra Mundial, com o objetivo de imunizar a população. A imunização com BCG era realizada em indivíduos com teste tuberculínico negativo (BEUTNER, 1997).

### 2.2 Epidemiologia

Na América Latina e Caribe existem aproximadamente 300 milhões de bovinos, dos quais 73,7% estão em áreas com prevalência de tuberculose bovina maior que 1,0%. Brasil e Argentina juntos possuem 3,5 milhões de bovinos infectados pelo bacilo tuberculoso e espalhados por todo o território; bovinos infectados representam quase 2,0% da população existente variando com a região, espécie e modo de produção (KANTOR; RITACCO, 1994).

A tuberculose bovina no passado foi considerada um grande problema de saúde pública por sua transmissão ao homem através do leite contaminado. Contudo, o desenvolvimento da pasteurização contribuiu intensamente para minimizar esse problema (O'REILLY; DABORN, 1995). A presença de *M. bovis* foi detectada em leite e derivados no Brasil e a contaminação por ingestão destes pode causar infecção (LEITE et al., 2003).

Na Argentina, que dispõem de uma alta taxa de diagnóstico bacteriológico para a tuberculose humana com isolamento e identificação do agente, a doença por *M. bovis* assume um caráter basicamente profissional, com transmissão principal por aerossóis. No mesmo país no período de 1984 a 1989, entre 2,4 e 6,2% dos casos humanos eram causados pelo bacilo bovino, sendo que 64,0% deles eram magarefes e tratadores de animais (LATINI et al., 1994).

Estima-se que as perdas econômicas decorrentes da tuberculose alcançam 10,0% da produtividade do gado leiteiro afetado (KANTOR, 1988). As perdas na produção leiteira chegam a 18,0%, com retardo da primeira lactação e diminuição do número e duração das lactações (NADER; HUSBERG, 1994), e a redução de 20,0% na produção de carne para gado de corte.

Há vários anos, os países ocidentais iniciaram seus programas de controle e erradicação da tuberculose bovina e apesar da aplicação de métodos substancialmente equivalentes, diversos foram os resultados obtidos pelos vários países. Na União Européia, onde a situação sanitária não é homogênea, existem países que erradicaram a doença como a Dinamarca, Holanda e Luxemburgo, países no qual a prevalência da doença é extremamente pequena no caso da Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França, Grécia e Portugal e outros onde a doença ainda não está suficientemente controlada como a Itália, Irlanda e Espanha. Pode-se dizer que um dos fatores determinantes para que atingissem a condição de controle ou erradicação da doença foi o empenho com que esses países perseguiram essas metas. Onde as operações de saneamento tiveram um andamento constante no tempo e homogêneo no espaço, os objetivos foram alcançados num menor intervalo de tempo (ROSALES RODRIGUEZ et al., 2004).

Apesar de não termos estatísticas que quantifiquem as perdas econômicas impostas pela tuberculose bovina em nosso país, tampouco o comprometimento humano, o Ministério da Agricultura lançou em janeiro de 2001 sua Campanha de combate a essa enfermidade (BRASIL, 2001).

### **2.3 Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**

O PNCEBT visa combater essas enfermidades, muito semelhantes, na população bovina e bubalina, diminuindo a incidência e prevalência dessas, a fim de minimizar as perdas econômicas e oferecer garantias de inocuidade dos alimentos, tanto carne como leite e derivados, ao consumo interno e aumentar a competitividade dos nossos produtos no mercado internacional.

Os pontos básicos do PNCEBT consistem em vacinação obrigatória contra brucelose e o controle de trânsito de animais, e a certificação voluntária de rebanhos livres ou monitorados para brucelose e tuberculose (BRASIL, 2001).

A certificação de rebanhos livres tem como alvo os rebanhos leiteiros e produtores de genética, onde não se admite a existência dessas enfermidades que possam ser transmitidas a outros animais e ao homem. Enquanto a certificação de propriedades monitoradas, nas quais se aplica a gestão de risco em amostragens aleatórias dos reprodutores do rebanho, tem como alvo rebanhos de corte, onde a prevalência esperada é baixa e o acompanhamento anual ou bianual oferece garantias de risco cada vez mais baixo da ocorrência dessas enfermidades (BRASIL, 2001).

### **2.4 Diagnóstico**

O diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina é realizado através do exame clínico e o teste tuberculínico, os exames *post mortem* se baseiam em histopatologia e bacteriologia das lesões tipo tuberculosas, incluindo sondas de DNA e técnica de PCR (HAAGSMA, 1995).

Segundo o PNCEBT o diagnóstico através da prova tuberculínica deve ser realizado da seguinte forma: (1) a tuberculinização por meio do Teste Cervical Simples (TCS) é adotada como prova de triagem devido a sua boa sensibilidade; (2) o Teste da Prega Caudal (TPC) também é utilizado como prova de triagem, porém exclusivamente em gado de corte; (3) o Teste Cervical Comparativo (TCC) é a única prova confirmatória, podendo ainda ser usada como prova de triagem em rebanhos com histórico de reações inespecíficas, em estabelecimentos certificados como livres e os de bubalinos, visando garantir boa especificidade diagnóstica (BRASIL, 2001).

O teste tuberculínico consiste na avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose. Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregados tuberculínicas sintéticas de dois

tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (RUGGIERO et al., 2007).

Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes tuberculínicos. Fatores como, infecção recente, final de gestação e desnutrição pode ocasionar falsos negativos aos testes. Contudo, animais em estado avançado de infecção podem manifestar o fenômeno de anergia, definido como ausência de reatividade cutânea à tuberculina em indivíduos previamente sensibilizados, cujo mecanismo ainda não está bem elucidado. Animais recém-infectados também não respondem ao teste tuberculínico.

Um pequeno número de reações não específicas pode ocorrer em animais tuberculinizados, visto que o teste simples caudal tem uma especificidade de 96,0 a 98,8% e o teste comparativo tem especificidade de pelo menos 99,0%.

O teste simples, com apenas uma aplicação de tuberculina bovina possui sensibilidade entre 32 e 99% e especificidade entre 75,5 e 99,9%, ou seja, possui grande sensibilidade e altíssima especificidade. Alguns fatores interferem na sensibilidade do teste tuberculínico, como a dose de tuberculina utilizada, os critérios de interpretação do teste, intervalo pós-infecção, no pós-parto, variações impostas pelo operador, entre outros (O'REILLY; DABORN, 1995).

O exame *post mortem* pode ser afetado pelo critério na inspeção da carcaça e os sítios observados e pode identificar até 95,0% dos animais com lesões macroscópicas (CORNER, 1994). O exame histopatológico pode ser aplicado principalmente em regiões de alta prevalência da doença por ser de conclusão mais rápida para o diagnóstico presuntivo, que deve ser confirmado em definitivo pelo cultivo da amostra (CORNER, 1994).

Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico da tuberculose são rápidos e de baixo custo, contudo exigem grandes concentrações de bactérias ( $10^4$  bacilos/ mL), ressalte-se ainda que outros microorganismos possam produzir lesões semelhantes a da tuberculose em bovinos (RUGGIERO et al., 2007).

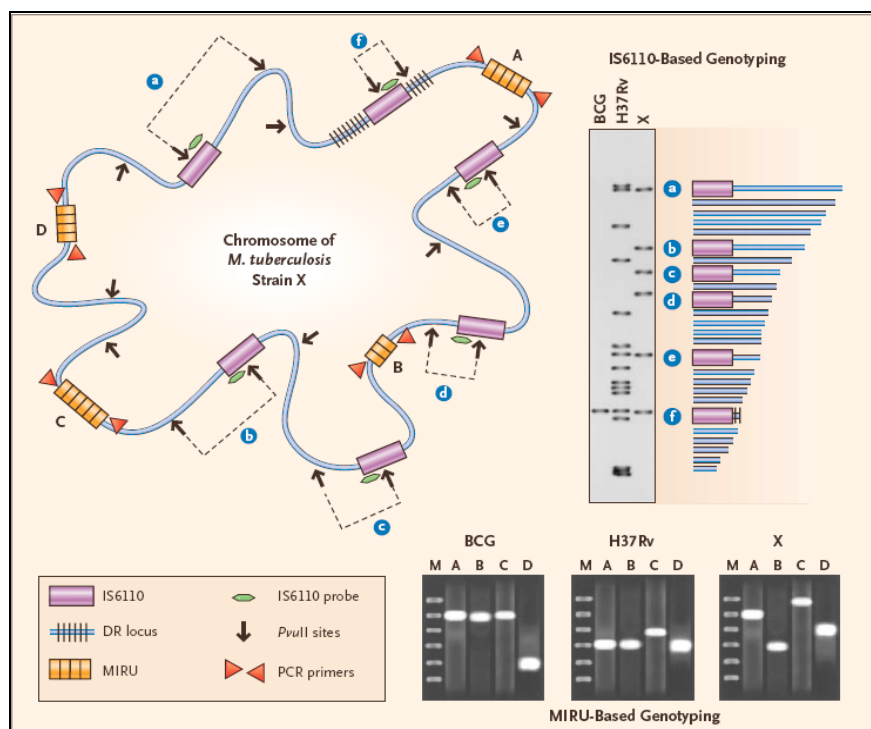
O cultivo para primo isolamento do *M. bovis* pode ser processado pelo método tradicional de Petroff ou pela descontaminação com cloreto de hexadecilpiridino e semeadura em meios à base de ovo, como Stonebrink, ou à base de ágar, como Middlebrook 7H11 e B83. O meio de cultura mais recomendado para isolamento de *M. bovis* é o Stonebrink contendo piruvato de sódio e não glicerina. O crescimento deste se dá após três a oito semanas de incubação. O isolamento de *M. bovis* pode demorar até mais de 12 semanas e a identificação da cepa isolada por métodos bioquímicos também é demorada (ROXO, 1997).

Embora o diagnóstico definitivo da tuberculose esteja fundamentado no isolamento e identificação do agente, esta metodologia apresenta aspectos restritivos para uso em larga escala. Isso porque, as técnicas bacteriológicas empregadas necessitam de uma grande quantidade de bacilos viáveis e consomem muito tempo de crescimento em meio de cultura (que pode variar de quatro a seis semanas). Exigências que nem sempre são atendidas em razão dos métodos drásticos de descontaminação do material, que além de destruir os contaminantes, também podem matar alguns bacilos o que compromete o isolamento (RUGGIERO et al., 2007).

## 2.5 Técnicas Moleculares

Um dos maiores retrocessos no estudo epidemiológico da propagação da infecção por *M. bovis* entre animais e homens, e particularmente entre bovinos, ou de animais selvagens para bovinos, tem sido a falta de um sistema confiável para a diferenciação de estirpes ou subespécies de *M. bovis*. Daí a necessidade de técnicas mais discriminatórias de modo a aumentar a confiabilidade dos resultados. A variabilidade da população bacteriana difere entre países e refletem tanto a filogenia quanto os mecanismos de transmissão (FIGUEIREDO et al., 2008).

O polimorfismo do *M. bovis* já vem sendo estudado através de métodos moleculares na América do Sul (ZUMARRAGA et al., 1999 e ZANINI et al., 2001, ROSALES RODRIGUES et al., 2004), na Europa (HADDAD et al., 2001; MALONE et al., 2003; GIBSON et al., 2004) e na África (NJANPOP-LAFOURCADE et al., 2001). A figura 1 mostra as diversas técnicas moleculares atualmente utilizadas para o complexo *M. tuberculosis*.



**Figura 1:** Técnicas moleculares utilizadas no complexo *M. tuberculosis*.

A distinção entre as espécies deste grupo foi elaborada através da análise de seqüências de DNA repetitivas, incluindo espaçadores na região Direct Repeat (DR) descrita por Hermans et al. (1991) e, mais recentemente, “Mycobacterial Interespersed Repetitive Units” (VNTR *loci*). A maior contribuição destes métodos está sendo o auxílio na elucidação da epidemiologia da tuberculose. Os métodos empregados vão desde análise dos padrões de restrições do DNA das estirpes, até técnicas muito mais complexas como Spoligotyping; Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR) e análise de deleções espécies-específicas (FROTHINGHAN; MEEKER-O’CONNEL, 1998).

### 2.5.1 Spoligotyping

Identifica o polimorfismo presente em um locus cromossomal, a região de repetição direta (DR), presente apenas em bactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. Através do spoligotyping, pode detectar a presença ou ausência de espaçadores de sequência conhecida. O primeiro passo no método é amplificar a região DR da amostra em estudo por Polymerase Chain Reaction (PCR). Os oligonucleotídeos derivados de espaçadores conhecidos são covalentemente ligados em linha paralela a uma membrana de nylon ativada. Os produtos de PCR são hibridizados perpendicularmente às linhas do oligonucleotídeos. A ligação entre o produto amplificado e os oligonucleotídeos é observada através de quimioluminescência detectada por um filme de raio-X, e uma de suas etapas o spoligotyping pode ser utilizado em amostras que apresentem poucos bacilos (ROSALES RODRIGUEZ, 2005).

Por utilizar PCR em Spoligotyping permite a identificação de *M. bovis*, diferenciando esta das outras espécies do complexo *M. tuberculosis* e permite a diferenciação de famílias de *M. tuberculosis*. Embora o método tenha certa capacidade para distinguir estirpes de *M. bovis*, o poder discriminatório do método utilizando versão desenvolvida para *M. tuberculosis* é menor em *M. bovis*. Por isso, a tipificação de estirpes de *M. bovis* pela técnica do Spoligotyping, em conjunção com o registro e observação dos movimentos dos bovinos entre as propriedades, são úteis em elucidar a epidemiologia da tuberculose bovina (ROSALES RODRIGUEZ, et al., 2004).

Zumarraga et al. (1999), analisando perfis de *M. bovis* na América do Sul utilizando o Spoligotyping, relataram à ampla distribuição dos mesmos em diferentes países. Zumarraga et al. (1999) e Haddad et al. (2001) descreveram os espoligotipos SB0140 como majoritário na Argentina, Paraguai e Uruguai. Tal situação ocorre principalmente devido a intensa movimentação de animais e através da comercialização dos mesmos, entre os países deste continente.

Acreditava-se que as estirpes de *M. bovis* na Irlanda, sejam particularmente homogêneas e que as diferenças genéticas sejam muito pequenas; por isso, requerem análises de outros marcadores genéticos para sua demonstração (GRANGE et al., 1990; COUSINS et al., 1993; BARRY et al., 1993).

### 2.5.2 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

É o método de rotina para a medicina forense e para os testes de paternidade. No genoma de *M. tuberculosis* foram encontradas várias seqüências repetitivas em série, também chamadas mini-satélites ou MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) (SUFFYS, et al., 20001). Foram encontrados 41 locus no *M. tuberculosis* onde se observou que algum deles eram mais polimórficos, os quais têm sido empregados em estudos epidemiológicos. Essas seqüências estão distribuídas em vários locus, variando de 40 a 100 pb. Para a análise, cada MIRU é amplificada separadamente por PCR, usando primers específicos para cada seqüência. O número de repetições é calculado pelo tamanho do produto amplificado.

Estudos utilizando-se as seqüências repetitivas, tipo VNTR, presentes em espécies do complexo *M. tuberculosis*, pode diferenciar estirpes, com o potencial de também ser utilizada para estudos filogenéticos (SKUCE et al., 1994).

Suffys et al. (2001) descreveram a utilização de 24 MIRUs para discriminação de isolados de *M. tuberculosis* e acredita-se que a avaliação de alguns dos demais 12 VNTRs resultara em maior poder discriminatório em *M. bovis*. Roring et al.(2002), utilizando QUB-VNTR e ETR-VNTR demonstram variabilidade em estirpes provenientes da Irlanda e Canadá e o poder discriminatório dos mesmos necessita avaliação no Brasil.

Devido à publicação do genoma da cepa *M. bovis* AF2122/97, é possível, através de análise *in sílico*, identificar novos VNTRs; nossos resultados preliminares já identificaram 670

repetições e 28 são específicos para *M. bovis*, quando comparando com *M. tuberculosis* (GARNIER et al., 2003) e esta abordagem nos permitiu desenvolver marcadores genéticos para *M. leprae* (TRUMAN et al. 2004). Espera-se que a análise combinada de *loci* resulte em diferenciação de *M. bovis* em nível de espécie (FROTHINGHAM; MEEKER-O'CONNELL, 1998).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de realização do trabalho

A parte do trabalho sobre o isolamento e identificação das micobactérias foi realizada no Laboratório de Tuberculose, do Laboratório Regional de Apoio Animal (LANAGRO), do MAPA em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. A outra parte da caracterização genética foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, do Departamento de Micobacterioses, da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

### 3.2 Amostras

As amostras analisadas nesse estudo foram procedentes de animais abatidos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). As lesões de animais com suspeita clínica de tuberculose foram enviadas ao LANAGRO no período de 2002 e 2004. As lesões coletadas foram acondicionadas em potes de plástico PVC e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o envio em caixa de isopor com gelo reciclável para o laboratório. Todo material foi acompanhado de formulário específico de encaminhamento para diagnóstico, fornecido pelo MAPA, que além de informações sobre a amostra continha dados epidemiológicos. As amostras positivas para *M. bovis* pelos métodos bioquímicos, foram selecionadas e enviadas para Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, do Departamento de Micobacterioses da Fundação Oswaldo Cruz, no município do Rio de Janeiro/RJ, para a caracterização molecular das cepas.

De cada material foi retirado o tecido conjuntivo adjacente e seccionado em fatias de dois a três milímetros de espessura. Para cada material foi utilizado instrumental recém-esterilizado. Das amostras com lesões, foi retirada aproximadamente 10 gramas de material, constituído da parte alterada e pequena quantidade de tecido normal. A descontaminação de todo material coletado foi realizada de acordo com Mota (1985) utilizando solução de ácido sulfúrico a 6% (v/v), durante 30 minutos, incluindo 15 minutos de centrifugação a 500 giros. O sedimento então foi lavado duas vezes com salina 0,85% (p/v) e depois inoculadas em quatro tubos contendo meio Stonebrink. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  durante dois meses.

O material restante foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização se a primeira inoculação fosse inviabilizada devido à contaminação ou a ausência de isolamento. Após incubação, culturas positivas foram examinadas pela coloração de Ziehl-Neelsen e caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares.

As provas bioquímicas foram realizadas conforme metodologia descrita pelo Centro Panamericano de Zoonosis (1988). Foram realizados testes da fita de niacina (Difco-USA), reação de redução de nitratos, cultivo em Löwenstein-Jensen (LJ) contendo  $100\mu\text{g/mL}$  de pirazinamida, prova de hidrólise do Tween (5-10 dias) e teste da atividade da catalase à  $68^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 Tipificação por Métodos Moleculares

#### 3.3.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o método CTAB (Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide) (van EMBDEN et. al.,1993). Uma pequena quantidade da cultura em meio Stonebrink foi transferida para microtubos contendo 500µL de tampão TE 1X. Os cultivos foram aquecidos em banho-maria à 80°C por 20 minutos para inativação das micobactérias. A lise bacteriana ocorreu pela adição de 50µL de lisozima e a mistura agitada em homogeneizador automático e em seguida incubada à 37°C por 18 horas. Após este período foram acrescentado 60µL de proteinase K (10mg/mL) e 70µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) a 10% (v/v), sendo a mistura então incubada em banho-maria à 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de solução de NaCl 5M e 80µL de CTAB a 10% (p/v), seguido de incubação por 10 minutos em banho-maria à 65°C. Em seguida, volumes iguais de clorofórmio (350µL) e álcool isoamílico foram adicionados e os tubos agitados em homogeneizador automático e centrifugados por cinco minutos a 12.000 x g à 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para novos tubos e adicionados 450µL de isopropanol à 4°C. Os tubos foram mantidos durante a noite à -20°C. Após este período os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 20 minutos e o sedimento lavado com 250µL de etanol 70% à 4°C. Em seguida a evaporação do etanol foi adicionada ao sedimento 50µL de tampão TE 1X e estocado a menos 20°C.

O resultado da extração do DNA foi verificado em gel de agarose a 0,8% (p/v) preparada em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio (10mg/mL). A corrida eletroforética foi efetuada a 75 mA por um período de 30 minutos e a concentração de DNA estimada em espectrofotômetro à 260 nm.

#### 3.3.2 Spoligotyping

A técnica de tipagem molecular Spoligotyping foi realizada conforme descrito por Kamerbeek et al. (1997) e van de Zanden et al. (2002). A amplificação das regiões espaçadoras pela PCR foi efetuada utilizando-se os iniciadores Dra (5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3' biotilado) e Drb (5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'), 10 a 20 ng de DNA alvo, 20 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP, uma unidade de Taq polimerase, tampão de enzima 1X e água destilada q.s.p. 30 ul. Em cada reação foram utilizados dois controles negativos e dois positivos, sendo estes últimos BCG Moureau e H37RV *M. tuberculosis*. Os ciclos de amplificação utilizados foram três minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 96°C por 60 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para hibridização dos produtos de PCR na membrana (KAMERBEEK et al.,1997), alíquotas de 30µl do produto de PCR amplificado foram diluídas em 150 µl de tampão 2X SSPE/0,1% SDS e desnaturadas a 99°C durante 10 minutos, em seguida foram imediatamente colocadas em banho de gelo. Esta mistura foi então aplicada ao “miniblotter” (Isogen, Holanda) onde previamente estava montada a membrana na qual se encontram adsorvidas as 43 seqüências correspondentes às regiões espaçadores “spacers” conhecidas do Complexo *M. tuberculosis*. A hibridização ocorreu a 60°C por um período de 60 minutos em uma superfície horizontal sem agitação. Após este período a membrana foi lavada duas vezes com 200 mL de tampão 2X SSPE/0,5% SDS a 60°C por 10 minutos, e então incubada com 10µL do conjugado HRPO a 42 °C por um período de 45 a 60 minutos. Em seguida a membrana foi lavada mais duas vezes com 2X SSPE a temperatura ambiente. Ao final das lavagens, a membrana foi incubada com aproximadamente 20 mL do líquido de detecção ECL (Kit ECL Amerham-



Pharmacia Biotech) para em seguida detectar por quimioluminescência a presença na membrana de produto de PCR híbrido após 60 minutos da exposição da membrana a Hyperfilm.

Os perfis obtidos foram analisados em programa de computador Bionumerics® (Applied Maths, Bélgica) e em Excel, tanto para identificação de perfis idênticos e definir famílias de perfis e perfis únicos. Avaliação da frequência da presença de cada espaçador indica quais são os marcadores que tem maior potencial de diferenciar cepas.

### 3.3.3 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

Inicialmente, analisamos em *M. bovis* os VNTRs descritos em *M. tuberculosis* (MIRU-VNTR), conforme Suffys et al. (2000) enquanto os recém descritos VNTRs com maior potencial em *M. bovis*, QUBs-VNTRs e ETR-VNTR, foram analisados segundo Roring et al. (2002). O perfil de VNTR de diferentes isolados de *M. bovis* foi determinado através da técnica de PCR com condições de ótimas para cada VNTR. Os MIRUs descritos são: 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40, demonstrados na tabela 1. Os reagentes de PCR são de 10 a 20 ng de DNA alvo, 100 pmol do iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA polimerase, tampão de enzima e água destilada q.s.p. As concentrações de MgCl<sub>2</sub> serão de 1mM para as reações 20 e 26, 1.5 mM para as reações 16, 24 e 27, 2.5mM para as reações MIRU 39 e 2mM para as demais. A relação dos primers de cada MIRU-VNTR está relacionada na tabela 1. Cada “mix” contem um volume final de 25µl. As condições de amplificação foram basicamente um ciclo à 95°C por cinco minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos à 95°C por 60 segundos; 55°C (MIRU-VNTR’S 24 e 26) ou 60°C (MIRU-VNTR’S 2, 4, 10, 16, 20, 23, 27, 31, 39 e 40) por 60 segundos para anelamento, 72°C por 90 segundos para extensão e um ciclo à 72°C por 10 minutos para extensão final. Para controle da amplificação, em cada reação foi utilizada a cepa BCG Moureau e dois controles negativos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética foi efetuada para obter resolução máxima para os diferentes VNTR, com tamanho variando de 250 a 1200 pb. A quantidade de repetições para cada VNTR foi determinada através de comparação com marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder). Os resultados obtidos após a visualização dos produtos de PCR foram convertidos para uma matriz numérica conforme Suffys et al. (2000).

**Tabela 1:** Lista de primers no MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis*

MIRU-VNTR	Primers (5'-3')
MIRU-02	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACTTACTCGGACGCCGGCTCAAAT
MIRU-04	GCGCGAGAGCCCGAACTGCGCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU-10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCCGCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU-16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTACCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU-20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAGGGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU-23	CTGTTCGATGGCCGCAACAAAACGAGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
MIRU-24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACATGGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU-26	AACGCTCAGCTGTTCGGATGGCCAGGTCCTTCCCGAT
MIRU-27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAAGCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU-31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTAGTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU-39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAACCGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU-40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGTGGGTGATCTCGGCCGAAATCAGATA

Fonte: Suffys et al., 2000.

### 3.3.4 Análise dos Spoligotyping x VNTRs

Os perfis obtidos para Spoligotyping foram pesquisados no banco de perfis disponível na Internet ([www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org)) com o objetivo de identificar aqueles comuns a outros países.

Os perfis genéticos obtidos (combinação dos VNTRs considerados) foram inseridos em programa de análise numérica Excel® para agrupamento de perfis idênticos seguindo a fórmula abaixo.

$$y=SE (N_x=N_{x-1}; "*" ; "" )$$

$N$  é a coluna que se insere a combinação numérica do MIRU-VNTR,  $x$  se insere a identificação da estirpe em análise, sendo  $x > 1$ .

### 3.3.5 Cálculo da Diversidade Alélica

Diversidade Alélica é um bom índice de heterogeneidade das amostras e também um bom índice de poder discriminatório fornecido pelos locis em estudo, com base neste índice, a amostra é considerada altamente discriminatória/polimórfica se  $h > 0,6$ ; moderadamente se  $0,3 \leq h \leq 0,6$  e fracamente se  $h < 0,3$  (SOLA et al., 2003).

### 3.3.6 Cálculo do Índice Hunter-Gaston de Discriminação (HGI)

O calculo do HGI das duas técnicas (Spoligotyping e MIRU – isoladas e em associações) foi feito conforme preconizado por Hunter; Gaston (1988), segundo a fórmula, onde  $n$  é o número de isolados em uma população,  $s$  é o número total de tipos descritos e  $n_j$  é o número de amostras pertencentes ao tipo  $j$ .

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

Hunter; Gaston (1988) sugeriram o uso do índice numérico de discriminação, baseado na probabilidade de duas amostras, não correlacionadas de uma população teste, serem identificadas como pertencentes a diferentes grupos, quando um teste for aplicado para estudos epidemiológicos é considerado eficiente, se possuir um índice de discriminação for de pelo menos 90,0%.

## 3.4 Distribuição dos espoligotipos isolados pelas mesorregiões do Estado de MG

As amostras enviadas ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, pelo LANAGRO, eram acompanhadas de um questionário, que caracterizava a procedência do animal, espécie, sexo e Estado da amostra.

Estabeleceu-se pela equipe executora deste trabalho que seriam computadas as amostras procedentes do Estado de Minas Gerais, para o calculo da frequência dos perfis detectados pelos testes moleculares.

Seguiram-se os dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), cuja divisão das mesorregiões do estado de Minas Gerais, corresponde a 12 mesorregiões e 66 microrregiões, discriminadas no quadro 1.

**Quadro 1 Mesorregiões Geográficas do Estado de Minas Gerais, segundo IBGE (2008)**

<b>Mesorregiões</b>	<b>Microrregiões</b>
Campos dos Vertentes	Barbacena, Lavras e São João del Rei.
Central Mineira	Bom Despacho, Curvelo e Três Marias.
Jequitinhonha	Almenara, Araçuaí, Capelinha, Diamantina, Pedra Azul, Palmópolis, Jequitinhonha.
Metropolitana de Belo Horizonte	Belo Horizonte, Conceição do Mato Dentro, Conselheiro Lafaiete, Itabira, Itagura, Ouro Preto, Pará de Minas, Sete Lagoas.
Noroeste de Minas Gerais	Paracatu, Unaí.
Norte de Minas Gerais	Bocaiúva, Grão Mogol, Janaúba, Montes Claros, Januária, Pirapora, Salinas.
Oeste de Minas Gerais	Campo Belo, Divinópolis, Formiga, Oliveira, Piumhi.
Sul e Sudoeste de Minas Gerais	Alfenas, Andrelândia, Itajubá, Passos, Poços de Caldas, Pouso Alegre, Santa Rita Sapucaí, São Lourenço, São Sebastião do Paraíso, Varginha.
Triângulo Mineira e Alto Paranaíba	Araxá, Frutal, Ituiutaba, Patos de Minas, Patrocínio, Uberaba, Uberlândia..
Vale do Mineira	Nanuque, Teófilo Otoni.
Vale do Rio Doce	Aimorés, Caratinga, Governador Valadares, Guanhães, Ibatinga, Mantena, Peçanha.
Zona da Mata	Juiz de Fora, Ubá, Muriaé, Manhuaçu, Ponte Nova, Cataguases, Viçosa.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amostras

Das 226 amostras positivas pelos métodos bioquímicos para *M. bovis*, enviadas pelo LANAGRO, ao Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, no período de 2002 e 2004, 11 amostras eram de outras espécies animais (nove bubalinos, um suíno e um camélídeo), os quais foram excluídos deste estudo, restando apenas 215 amostras de bovinos.

Destas 215/183 (85,0%) amostras eram do Estado de Minas Gerais, 11 contaminaram durante o procedimento bacteriológico, restando 172 amostras para a caracterização molecular das cepas, no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses, do Departamento de Micobacterioses da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Estes dados estão demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2** Distribuição das amostras enviadas pelo LANAGRO/MG, no período de 2002 a 2004, para o Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada à Micobacterioses (Fiocruz), desde o envio até a submissão dos testes moleculares.

Demonstrativo do número de amostras do LANAGRO a Fiocruz/RJ	Número de amostras
Amostras positivas nos testes bioquímicos para <i>M. bovis</i>	226
Amostras da espécie bovina	215
Referentes ao Estado de Minas Gerais	183
Amostras contaminaram no procedimento bacteriológico	11
Total das amostras enviadas e submetidas aos testes moleculares	<b>172</b>

### 4.2 Spoligotyping

O método Spoligotyping foi aplicado as 172 amostras do Estado de Minas Gerais, destas 11 não amplificaram, restando 159 amostras, das quais 31 apresentaram perfis diferentes, sendo 23 agrupados e 8 individuais. Os perfis encontrados bem como o número de amostras correspondentes em cada perfil podem ser encontrados na tabela 3.



O sexto perfil SB0140 (4,0%) é predominante na Austrália, Argentina, Irlanda e no Reino Unido (COUSINS et al., 1998; ZUMARRAGA et al., 1999; COSTELLO et al., 1999; HADDAD et al., 2001). Descrito no Paraguai, Uruguai e predominante no México (ZUMARRAGA et al., 1999, ROSALES RODRIGUES et al., 2004 e COBOS-MARIN et al., 2005). Está associado a 30,0% dos casos da doença em bovino no Brasil (HADDAD et al., 2001). Gibson et al. (2004) relataram 15/50 casos de tuberculose humana, no período de 1997 a 2000 no Reino Unido devido a este espoligotipo. Os perfis SB1050 (3,1%) e SB1055 (1,9%) foram relatados na Argentina, Uruguai, Paraguai, México e Costa Rica (HADDAD et al., 2001).

O oitavo perfil SB0120 (2,5%), denominado de BCG-like por Haddad et al. (2001) é o mais freqüente na França (26,0%) e na Itália (54,6%) nos rebanhos infectados por *M. bovis*. Também foi identificado na Bélgica, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Holanda e Algéria (KREMER et al., 1999; van EMBDEN et al.; 2000; HADDAD et al., 2001), no Brasil, Rosales Rodrigues (2005) descreveu com terceira freqüência de 8,9% dos isolados de São Paulo. Possui a característica de ter uma grande diversidade de hospedeiros, pois, além de bovinos, já foi isolado de cabras, ovelhas, suínos e animais silvestres (HADDAD et al., 2001).

O perfil SB1033 (1,9%) esteve presente nos estudo de Cousins et al. (1998), assim como o perfil SB0131 (1,3%) descrito por Kremer et al.(1999). O perfil SB0134 (1,3%) foi encontrado na Bélgica e o SB0122 (1,9%) na Holanda por Haddad et al.(2001).

Com as freqüências de 1,3% (dois isolamentos) para os perfis SB1139, SB1380, SB0134, SB1136 e os agrupamentos GS8, GS9, GS14, GS15, GS19. Os perfis SB1139 e SB1136 foram relatados no Brasil por Rosales Rodrigues; Neto (2004). O perfil SB1380 foi isolado na Espanha por Aranaz et al. (1996). O perfil SB0134 foi relatado em São Paulo, com a freqüência de 2,4% por Rosales Rodrigues; Neto (2004).

Estes estudos mostram que há no Brasil espoligotipos que parecem, até o momento compartilhado entre Brasil, Europa, Ásia, Oriente e África (SB0120), entre Brasil, América latina e Europa (SB0140 e SB0131), entre Brasil e Europa (SB0295, SB0121, SB0881, SB0314 e SB0122), demonstrando relações epidemiológicas entre o Brasil e estas regiões.

Em relação aos perfis SB0121 e SB0295 os mesmos estão muito próximos, pois há uma única diferença no espaçador 37, que está ausente no grupo SB0295 e presente no SB0121. Também está próximo do perfil SB0120, difere apenas pela ausência do espaçador 21, mostrando talvez uma evolução das cepas. Com esta análise nos permite valorizar o uso da técnica de spoligotyping aplicada ao sistema de vigilância para detecção de novos focos de tuberculose bovina, assim identificando focos de tuberculose humana devido ao *M. bovis*.

### 4.3 MIRU-VNTR

O método de MIRU-VNTR aplicado a 159 isolados revelou a presença de 40 perfis diferentes, sendo 18 individuais e 21 agrupados. A tabela 4 mostra os perfis encontrados bem como o número de amostra correspondente a cada perfil.

**Tabela 4:** Perfis de MIRU-VNTR com o número de amostras correspondentes

Agrupamento	Perfil	Nº. de isolados	Agrupamento	Perfil	Nº. de isolados
GM1	132224253322	4	GM21	242324263322	2
GM2	222224233322	2	*	212224253322	1
GM3	222324253322	2	*	224424121525	1
GM4	232224153322	2	*	226424121425	1
GM5	232224223522	2	*	232224223622	1
GM6	232224233222	9	*	232224233522	1
GM7	232224243322	7	*	232224251222	1
GM8	232224253222	9	*	232324252322	1
GM9	232224263322	4	*	232322253322	1
GM10	232322253312	4	*	232324113322	1
GM11	232324233322	14	*	232324233321	1
GM12	232324242422	2	*	232324253422	1
GM13	232324243322	16	*	232324253522	1
GM14	232324251222	2	*	232324263322	1
GM15	232324252422	6	*	232324283322	1
GM16	232324253222	3	*	232324453322	1
GM17	232324253321	3	*	232334251322	1
GM18	232324253322	63	*	232424233322	1
GM19	232424243322	8	*	232424533322	1

(\*) isolados individuais

Foram observadas as maiores frequências para os grupos GM 18 (33,0%) com 63 amostras isoladas, GM 13 com 16 (9,30%) amostras e os grupos GM 2, 3, 4, 5, 12, 14, e 21 apresentaram dois (1,16%) isolamentos.

### 4.4 Diversidade Alélica

A diversidade alélica de cada sistema de MIRU-VNTR foram avaliadas e apresentadas na tabela 5. Os MIRUs 16, 26 e 31 apresentaram a maior diversidade alélica, enquanto que o MIRU 20 praticamente não apresentou variabilidade, pois em apenas uma amostra foi observado o alelo 3 enquanto que nas outras amostras observou-se o alelo 2.

O MIRU 24 apesar de apresentar uma diversidade alélica baixa, mostrou-se um bom marcador para diferenciar isolado de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, uma vez que *M. bovis* apresentou em sua maioria o alelo 2 e *M. tuberculosis* apresentou o alelo 1, sendo talvez, esse sistema um bom marcador de escolha para diferenciar essas espécies.

**Tabela 5** Diversidade alélica do MIRU-VNTR

MIRU	Diversidade
2	0,04
4	0,07
10	0,03
16	0,48
20	0,01
23	0,07
24	0,04
26	0,58
27	0,14
31	0,23
39	0,05
40	0,07

Comparando os resultados do índice Hunter-Gaston, para os dois métodos temos um poder de diferenciação (HGDI) de 0,86 para o Spoligotyping e de 0,87 para o MIRU-VNTR individualmente e de 0,97 comparando as duas técnicas juntas. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Allix et al. (2006), que encontrou resultados semelhantes comparando essas duas técnicas.

De todos os isolados oito apresentaram resultado diferente para *M. bovis* na técnica de *Spoligotyping* e em alguns sistemas do MIRU-VNTR não amplificaram, estas amostras estão sendo analisadas por outros métodos de diferenciação molecular, tais como primer MTUB que diferencia as espécies do complexo *M. tuberculosis* e Polymerase Chain Reaction-Polymerase Restriction Analysis (PCR-PRA) que diferencia Micobactérias atípicas e confirmando a espécie.

#### 4.5 Distribuição dos isolados pelo Spoligotyping pelas mesorregiões do Estado de MG

As mesorregiões Sul e Sudoeste do Estado de Minas Gerais são bacias leiteiras tradicionais com sistema de produção semi-intensivo a intensivo, apresentou 27,32% dos isolados, em segundo 26,16% Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (tabela 6).

**Tabela 6** Distribuição das amostras isoladas de *M.bovis* por spoligotyping pelas mesorregiões de MG.

Mesorregiões de MG	Número de Isolados	%
Sul e Sudoeste de MG	47	27,32
Triangulo Mineiro e Alto Paranaíba	45	26,16
Metropolitana de MG	23	13,40
Zona da Mata	20	11,62
Oeste de MG	14	8,13
Vale do Rio Doce	10	5,81
Vale do Mucuri	05	2,90
Norte de MG	03	1,73
Campos dos Vertentes	02	1,17
Noroeste de MG	02	1,17
Central Mineira	01	0,59
<b>Total</b>	<b>172</b>	<b>100,0</b>

O risco de ocorrer tuberculose bovina é maior nos sistemas de leite e com maior tecnificação da produção como descrito por Belchior (2001), mas observa-se a presença de *Mycobacterium bovis*, no gado de corte, seria a origem principal das amostras analisadas. Os bovinos criados nas mesorregiões Sul e Sudeste de MG, pelo próprio tipo de manejo que são



submetidos, tendem a ser mais susceptíveis a contaminação por estarem em alta densidade populacional e aglomerado, fato que permite contaminação intensa por via aerógena. Além disso, o estresse metabólico constante em que ficam submetidos leva-os a uma baixa imunidade e aumenta as chances de manifestação clínica da tuberculose. As propriedades com este sistema de produção apresentam uma prevalência superior e casos de tuberculose em relação aquelas com menor grau de tecnificação.

Comparando os principais espilogotipos isolados SB0121, SB0295 e SB0881 com a sua distribuição por mesorregiões do Estado de Minas Gerais (tabela 7). Observa-se que o perfil SB0121 foi encontrado com maior frequência nas regiões Sul e Sudoeste e Metropolitana de MG e o perfil SB0295 maior frequência na região Metropolitana e do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, esses resultados ilustram a disseminação de perfis nos país conforme relatado por Zumarraga et al. (1999). Os demais espilogotipos e a sua distribuição por mesorregião estão disponíveis no anexo B.

Tabela 7 Os principais espilogotipos de *M. bovis* com maior frequência neste estudo e a sua distribuição pelas mesorregiões de MG.

Espilogotipos	Metropolitana MG	Oeste de MG	Vale do Mucuri	Noroeste de MG	Norte de MG	Sul e Sudoeste	T.Mineiro e Alto Paranaíba	Vale do Mineira	Zona Mata
<b>SB0121</b>	8	6	0	1	0	18	6	1	4
<b>SB0295</b>	12	2	0	0	0	4	8	0	1
<b>SB0881</b>	2	1	0	0	0	2	0	1	1

Quanto à frequência de MIRU por mesorregiões, constatou-se a maior frequência do GM 18, nas mesorregiões Metropolitana de MG (10), Sul e Sudoeste (9), Zona da Mata (6), as demais distribuições estão disponíveis no Anexo B.

Esta distribuição de MIRU e espilogotipo evidencia a disseminação de perfis nos país conforme já relatado por Zumarraga et al. (1999). Na América dos Sul, este fato se deve ao trânsito de animais por exposições agropecuárias, leilões e principalmente pelo comércio dos mesmos, aplicado para o gado de corte e de leite.

## 5 CONCLUSÕES

Ambas as técnicas testadas para identificação de *M. bovis*, foram eficazes, tanto o *Spoligotyping* quanto o MIRU-VNTR.

A técnica de *Spoligotyping* apresentou maior eficiência, mais fácil execução e rapidez na análise dos resultados; sendo a de MIRU-VNTR de boa reprodutibilidade trabalhando-se com amostras de *M. bovis*, quando comparadas às amostras de *M tuberculosis*.

Este estudo nos permitiu identificar o perfil circulante das estirpes de *M. bovis* nas regiões estudadas, bem como compreender a dinâmica da transmissão da doença, ajudando assim, ao PNCEBT na rastreabilidade animal, monitorando através destas técnicas o trânsito de animais dentro do país, localizando o foco da doença e permitindo assim a implementação de medidas para bloquear a disseminação do agente.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIX, C., WALRAVENS, K.O; SAEGERMAN, C., GODFROID, J.O; SUFFYS, P.; FAUVILLE-DUFAUX, M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, n.6, p.1951–1962, 2006.

ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ,L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZOLEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; BUNSCHOTEN, A.E; van EMBDEN, J.D.A.; COUSINS, D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains form cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.11, p.2734-2740, 1996.

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., Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p.2602–2608, 2004.

BARRY, T.; GLENNON, M.; SMITH, T. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR probe methods. *Veterinary Record*, v.132, n.1, p.66-67, 1993.

BELCHIOR, A.P. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. 2001 (*Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária*), Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

BEUTNER, E.H. Tuberculosis of the skin: historical perspectives on tuberculin and Bacille Calmette Guérin. *International Journal Dermatology*, v. 36, n. 1, p.73-77, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n.2, 10 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União, Brasília, 2001*.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Bacteriologia de la Tuberculosis*. Buenos Aires, 1988, 63 p.

COBOS-MARÍN, L; MONTES-VARGAS, J; ZUMARRAGA, M.; CATALDI, A; ROMANO, M.V I; ESTRADA-GARCIA, I.;GONZALEZ-Y-MERCHAND, J.A. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Canadian Journal Microbiology*, v.51, n.11, p 996–1000, 2005.

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

COSTELLO, E.; O`GRAY, D.; FLYNN, O; O`BRIEN, R.; ROGERS, M.; OUIGLEY, F.; EGAN,J.; GRIFFIN, J. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3217-3222, 1999.

COUSINS, D.V.; WILLIAMS, S.N.; LIEBANA, E.; ARANAZ, A.; BUNSCHOTEN, A.; van EMBDEN, J.V.; ELLIS, T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.1, p.168-178, 1998.

FIGUEIREDO, E.E.S.; SILVA, M.G.; FONSECA, L. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V.M.F. Detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no leite pela reação em cadeia da polimerase seguida da análise de restrição do fragmento amplificado (PRA). *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.4, p. 1023-1033, 2008.

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

GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, J.C; MEDINA, N., MANSOOR, H., PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S; HARRIS, B.: ATKIN, R.; DOGGETT, J., MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.R.; PARKHILL, J.; G. BARRELL; B.G.; STEWART ; B.G; COLE, T.; V. GORDON, S.V; GLYN HEWINSON, R. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.13, p.7877–7882, 2003.

GIBSON, A.L., HEWINSON, G., GOODCHILD, T., WATT, B., STORY, A., INWALD, J., DROBNIENSK, F.A. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.1, p. 431-434, 2004.

GRANGE, J.M.; COLLINS, J.D.; O'REILLY, L.M. et al. Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. *Veterinary Journal*, v.43, n.2, p.33-5, 1990.

HAAGSMA, J. OIE Manual (Amendment 2), *Bovine tuberculosis* p.11, 1995.

HADDAD, N., OSTYN, A., KAROU, C., MASSELOT, M., THOREL, M.F., HUGHES, S.L., INWALD, J., HEWINSON, R. G., DURAND, B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 10, p. 3623–3632, 2001.

HEIFETS, L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v.23, n. 3, p. 283-295, 2004.

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

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A; AGTERVELD, M.; SOOLINGEN, D., KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.2, p.907-914, 1997.

KANTOR, I.N.; RITACO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1, p.5-14, 1994.

KREMER, K., VAN SOOLINGEN, R D, FROTHINGHAM, W. H., DE HAAS, P. W. M., HERMANS, C., MARTIN, P., PALITTAPONGARNPIM, B. B, PLIKAYTIS, L. W., RILEY, M., YAKRUS, A., MUSSER, J.M., VAN EMBDEN, J.D.A. 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, p.2607–2618, 1999.

KOX, L. F., RHIENTHONG, D., MIRANDA, A.M., UDOMSANTISUK, N., ELLIS, K., VAN LEEUWEN, J., VAN HEUSDEN, S., KUIJPER, S., KOLK, A. H. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p.672–678, 1995.

LATINI, M.S.; LATINI, O. A.; LOPEZ, M. L.; CECCONI, J. O. In: KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C. Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n.3, p.319-323, 2003.

MALONE, F. E., WILSON, E.C., POLLOCK, J.M.; SKUCE, R.A. Investigations into an Outbreak of Tuberculosis in a Flock of Sheep in Contact with Tuberculosis Cattle, *Journal Veterinary Medicine B*, v. 50, p. 500–504, 2003.

MOTA, P. M .P .C Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas da tuberculose bovina. 1985. (*Dissertação, Mestrado em Microbiologia*) - Escola de Veterinária UFMG.

NADER, A.; HUSBERG, H. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. In: KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

NJANPOP-LAFOURCADE, B.M., INWALD, J., OSTYN, A., DURAND, B., HUGHES, S., THOREL, M.F., HEWINSON, G., HADDAD, N. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, 222–227, 2001.

RORING, S.; SCOTT, A.; BRITAIN, D. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using exact tandem repeats and *spoligotyping*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.6, p.2126-2133, 2002.

ROSALES RODRIGUES, C.A.; ZUMARRAGA, M.J.; OLIVEIRA, E.M.D.; CATALDI, A.A.; ROMANO, M.I.; OTTO, H.H.; BONAFE, V.L.; FERREIRA NETO, J.S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de *Spoligotyping*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, n.3, p.277-282, 2004.

ROSALES RODRIGUES, C.A. Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos, 86p. *Tese (Doutorado)*, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

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

RUGGIERO, A. P., IKUNO A. A., FERREIRA V. C. A, ROXO E Tuberculose Bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arquivo Instituto Biológico de São Paulo*, v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SKUCE, R.A.; BRITTAIN, D.; HUGHES, M.S. et al. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal Clinical Microbiology*, v.32, n. 2, p.2387-92, 1994.

SOLA, C.; FILLIOLI, I.; LEGRANDE, E.; LESJEANS, S.; LOCHT, C. ; SUPPLY, P. ; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU`s: association with an *Spoligotyping* for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v,3, p.125-133, 2003.

SUFFYS, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human mini-satellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v.36, p.762-771, 2000.

SUFFYS, P.; LESJEAN S.; SAVINE E, KREMER, D. K; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n.10, p. 3563-3571, 2001.

TRUMAN, R.; FONTES, A.B.; MIRANDA, A.M.; SUFFYS, P.; GILLIS, T. Genotypic Variation and Stability of four Variable Number Tandem Repeats and their Suitability for Discriminating Strains of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.6, p.2558-2565, 2004.

Van de ZANDEN, A.G.M.; KREMER, K.; SCHOULS, L.M.; CAIMI, K.; CATALDI, A.; HULLEMAN, A.; NAGELKERKE, N.J.D.; and van SOOLINGEN, D. Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.12, p. 4628–4639, 2002.

Van EMBDEN, J.D., CAVE, M.D., CRAWFORD, J.T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.1, p.406-409, 1993.

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

ZANINI, M.S., MOREIRA, E.C., LOPES, M.T.P., OLIVEIRA, R. S., LEÃO, S.C., RL FIORAVANTI, R.L., ROXO. E., ZUMARRAGA, M., ROMANO, M.I., CATALDI, A., SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and

restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n. 6, p. 809-813, 2001.

ZUMARRAGA, M.J.; MARTIN, C.; SAMPER, S. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n. 2, p. 296-303, 1999.

## ANEXOS

### A – Soluções e Reagentes

#### Solução 1 – SDS 10%

SDS.....10g  
H<sub>2</sub>O.....q.s.p.....100 ml

#### Solução 2 – SSPE 20 X

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,2 M  
NaCl.....36 M  
EDTA 0,5 M.....40 ml ou 7,4 g  
H<sub>2</sub>O.....q.s.p.....1000ml

**pH = 7,4**

Autoclavar por 121°C por 15 minutos

#### Solução 3 – EDTA 0,5 M

EDTA .....372,26g  
H<sub>2</sub>O ....q.s.p.....500ml

**pH = 8,0**

#### Solução 4 – TBE 10 X

Ácido Bórico .....55g  
Tris-base.....108g  
EDTA 0,5 M .....40 ml ou 9,3 g  
H<sub>2</sub>O.....q.s.p.....1000 ml

#### Solução 5 – TE 1 X

Tris-HCl 1 M.....50 ul  
EDTA 0,5 M .....100 ul  
H<sub>2</sub>O.....q.s.p.....50 ml

**pH = 8,0**



## B - Distribuição dos perfis de Spoligotyping e MIRU-VNTR nas regiões estudadas

Espoligotipo	Metropolitana MG	Oeste de MG	Vale do Mucuri	Noroeste de MG	Norte de MG	Sul e Sudoeste	Triang .Mineiro A. Paranaíba	Vale do Mineira	Zona Mata
SB0121	8	6	0	1	0	18	6	1	4
SB0120	1	0	0	0	0	0	0	0	0
SB0295	12	2	0	0	0	4	8	0	1
SB0881	2	1	0	0	0	2	0	1	1
SB1033	1	1	0	0	0	2	0	0	0
SB0131	1	0	0	0	0	0	1	0	0
SB1136	1	0	1	0	0	0	0	0	0
SB1380	0	1	0	0	0	0	0	0	0
SB0140	0	0	0	1	0	2	2	0	0
SB1145	0	0	2	0	2	1	0	1	1
SB0274	0	0	0	0	0	0	2	0	1
SB0134	0	0	0	0	0	2	0	0	0
SB 1209	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SB0122	0	0	0	0	0	2	0	0	0
SB1055	0	0	0	0	0	1	0	0	0
SB1050	0	0	0	0	0	0	5	0	0
SB1139	0	0	0	0	0	0	1	0	0
GS8	1	0	0	0	0	0	0	0	1
GS9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
GS14	2	0	0	0	0	0	0	0	0

MIRU	Metropolitana MG	Oeste de MG	Vale do Mucuri	Noroeste de MG	Norte de MG	Sul e Sudoeste	Triangulo mineiro e Alto Paranaíba	Vale do Mineira	Zona Mata
GM1	3								
GM2							1		
GM4									1
GM5						1			
GM6							2		1
GM7						2	1		
GM8						1	1		
GM9	3								
GM10							4		
GM11	5	2				2	1		
GM13	3	2				3		3	2
GM15	1		1			2	1		
GM16						1			
GM17						1			
GM18	10	2	3	1	2	9	3		6
GM19						7			
GM20	1	3				1			
GM21							1		1

