

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

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium
bovis* DE BOVINOS POSITIVOS NO TESTE
INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE EM MATO
GROSSO DO SUL, BRASIL**

Daniela de Oliveira Cazola

**CAMPO GRANDE, MS
2014**

2014		IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE <i>Mycobacterium bovis</i> DE BOVINOS POSITIVOS NO TESTE INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL, BRASIL	CAZOLA
------	--	--	--------

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

IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium bovis* DE BOVINOS POSITIVOS NO TESTE INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Identification and genotyping of *Mycobacterium bovis* from positive cattle in skin test for tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil

Daniela de Oliveira Cazola

Orientador: Prof. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Co-orientador: Prof. Dra. Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge

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
2014

À minha família por todo amor, carinho e compreensão que me dedicam.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta conquista.

À minha orientadora, professora Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório.

À minha co-orientadora, professora Dra. Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge.

À minha mãe pelo apoio e ensinamentos.

À equipe da Embrapa Gado de Corte: Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos e as doutorandas Ana Beatriz Castelão e Cristina Pires Araújo.

Aos mestrandos e doutorandos Amanda Carvalho, Antonio Belarmino, Ariany Carvalho, Dyego Borges e Flávia Bacha.

Ao meu colega Antonio Francisco de Souza Filho.

À Superintendência Federal da Agricultura do Estado de Mato Grosso do Sul, MAPA.

À Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul, IAGRO.

“Você é do tamanho dos seus sonhos.”

Resumo

CAZOLA, D. O. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* de bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil. 2014. 44 f. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Mycobacterium bovis, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é a espécie mais frequente envolvida em casos de tuberculose bovina. É uma doença de alta relevância econômica para a criação de bovinos, pois interfere diretamente na sua produtividade e também influencia o comércio internacional dos animais e de seus produtos, além de representar risco à saúde pública devido a seu aspecto zoonótico. A combinação do isolamento micobacteriano em meio de cultura a partir de tecidos bovinos com a identificação e genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis* o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle da doença. A técnica de *spoligotyping* possibilita a detecção e genotipagem das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, além de permitir diferenciação de cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Dessa forma, a proposta deste estudo baseou-se no isolamento, identificação e genotipagem por meio da técnica de *spoligotyping* de amostras bacterianas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), a partir de tecidos de bovinos positivos em teste intradérmico comparativo para o diagnóstico da tuberculose em Mato Grosso do Sul. Treze isolados de BAAR foram identificados por PCR multiplex (m-PCR) como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* spp., complexo *M. tuberculosis* ou como da espécie *M. bovis*. Com base no *spoligotyping* oito amostras bacterianas foram agrupados dentro de três diferentes agrupamentos de genótipos e uma amostra bacteriana remanescente apresentou perfil único, sendo quatro amostras bacterianas com padrão de espoligotipo SB0121, duas SB1145, duas SB0881 e uma SB0140. A aplicação da técnica de epidemiologia molecular *spoligotyping*, em amostras bacterianas de BAAR obtidos a partir de tecidos provenientes de bovinos positivos em teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose em Mato Grosso do Sul, demonstrou que há diversidade genética entre os espoligotipos presentes no estado, embora predomine o perfil SB0121.

Palavras-chave: identificação molecular, epidemiologia molecular, *spoligotyping*, tuberculose bovina.

Abstract

CAZOLA, D. O. Identification and genotyping of *Mycobacterium bovis* from positive cattle in skin test for tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brasil. 2014. 44 f. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Mycobacterium bovis, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, is the most common specie involved in cases of bovine tuberculosis. It is a disease of high economic importance to cattle, as directly interferes with your productivity and to influence the international trade of animals and animal products, and represent a risk to public health due to its zoonotic aspect. The combination of mycobacterial isolation in culture medium from bovine tissues with the identification and molecular genotyping has contributed to better understanding of the epidemiology of infection by *M. bovis* which provides increased efficiency of disease control programs. The spoligotyping enables the detection and genotyping of mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex, and allow strain differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Thus, the purpose of this study is based on the isolation, identification and genotyping by spoligotyping of isolates of acid-fast bacilli (AFB) from tissues of cattle positive in comparative intradermal test of tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul. Thirteen isolates were identified by multiplex PCR (m-PCR) as the genus *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* complex or as specie *M. bovis*. Based on spoligotyping eight isolates were grouped into three different clusters and isolated remnant presented a unique profile, four isolates with spoligotype pattern SB0121, SB1145 two isolates, two isolates SB0881 and an isolated SB0140. The application of the technique of spoligotyping in molecular epidemiology of AFB isolates obtained from tissues of cattle positive in skin test of tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul has shown that there is genetic diversity among spoligotypes found in the state of Mato Grosso do Sul, although there is a predominant.

Keywords: molecular identification, molecular epidemiology, spoligotyping, bovine tuberculosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Agente etiológico	12
3.2 Diagnóstico	13
3.2.1 Teste intradérmico	14
3.2.2 Detecção de interferon gama plasmático	15
3.2.3 Testes sorológicos	16
3.2.4 Inspeção durante o abate	18
3.2.5 Exame bacteriológico	19
3.2.6 Identificação molecular	21
3.2.7 Epidemiologia molecular	22
REFERÊNCIAS	26
ARTIGO	35
Identificação e genotipagem de <i>Mycobacterium bovis</i> de bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil	35

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é umas das mais graves e antigas enfermidades conhecidas. Está distribuída por todo mundo, com maior prevalência em países em desenvolvimento. É uma doença infecto-contagiosa crônica causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (REVIRIEGO; VERMEERSCH, 2006).

Em bovinos, *Mycobacterium bovis* é a espécie mais frequente envolvida em casos de tuberculose, embora outras espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* possam ser detectadas (ALFREDSEN; SAXEGAARD, 1992; VAN INGEN et al., 2012).

A tuberculose bovina é classificada como doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). É uma doença de alta relevância econômica para a criação de bovinos, pois a condenação de carcaças em matadouros frigoríficos sob inspeção sanitária compromete o comércio internacional dos produtos de origem animal, além do prestígio e credibilidade da propriedade (BRASIL, 2006). Por seu aspecto zoonótico a tuberculose bovina representa risco a saúde pública tanto pela transmissão direta do patógeno do animal para o homem, quanto indiretamente pelo consumo de produtos de origem animal contaminados (ROXO, 1997; VALENTE et al., 2011; MICHEL et al., 2010).

Embora o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Animal (PNCEBT) tenha sido instituído em 2001 com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência destas doenças no país, ainda não existe um dado de prevalência média da tuberculose no Brasil. No passado, pesquisadores interessados em fomentar o controle da doença estimaram a prevalência média nacional em 1,3%, a partir de dados obtidos em pequenos estudos regionais. Atualmente, o estudo epidemiológico da doença já foi concluído em alguns estados, e a prevalência de focos e de casos foram respectivamente 0,57% e 0,25% no estado da Paraíba (FIGUEIREDO, S. M. et al., 2010), 2,15% e 0,42% no Paraná (SILVA et al., 2012), 1,6% e 0,21% na Bahia (ÁVILA et al., 2012), 1,3% e 0,123% no Mato Grosso (NÉSPOLI, 2012) e 2,3% e 0,1% em Rondônia (VENDRAME, 2013). Esses dados mais recentes obtidos com amostragens planejadas (rebanhos e

animais) serão úteis para o conhecimento da real prevalência da tuberculose bovina no Brasil, e possivelmente contribuirão para avaliação do PNCEBT.

No Mato Grosso do Sul o inquérito epidemiológico para determinação da prevalência de tuberculose bovina no estado está em andamento, entretanto já existem alguns estudos pontuais que demonstram a presença da doença. Schenk; Schenk (1982) observaram 0,2% de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose em matadouros frigoríficos, no período de 1974 a 1979. Jorge (2001), ao estudar amostras de órgãos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose observou crescimento de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em 28,9% das amostras estudadas. A análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou que 63,6% eram *Mycobacterium spp.*, e destas, 71,43% pertenciam ao CMT. Da mesma forma, Araújo et al. (2005) obtiveram isolamento de BAAR em 23,6%, sendo a espécie *M. bovis* confirmada por PCR em 76,5%.

Azambuja (2010) ao realizar estudo sobre aspectos clínicos e de diagnóstico da tuberculose em bovinos leiteiros de Caarapó (MS), identificou focos da doença mediante investigação clínica, post-mortem e bacteriológica. Dos 200 bovinos submetidos ao teste cervical comparativo (TCC), 24 (12%) foram positivos. O cultivo dos fragmentos de tecidos, com ou sem lesão sugestiva de tuberculose, colhidos durante o abate sanitário revelou BAAR e a espécie *M. bovis* foi confirmada por PCR.

Diante do impacto negativo da infecção por *M. bovis* causado a saúde humana e animal, torna-se necessária a caracterização bacteriológica com a comprovação da infecção por meio do isolamento do agente, considerado o padrão ouro de diagnóstico. A identificação das amostras bacterianas isoladas e a discriminação das cepas é a base para estudos epidemiológicos da tuberculose envolvendo fontes e vias de infecção, transmissão e distribuição geográfica (CORNER, 1994; OIE, 2009). Cabe ressaltar que o regulamento do PNCEBT prevê análises bacteriológicas completas em situações inconclusivas durante a inspeção de produtos de origem animal ou necropsia.

No estado de Mato Grosso do Sul este é o primeiro estudo bacteriológico e molecular realizado, cujas amostras utilizadas foram obtidas de bovinos positivos no TCC provenientes de rebanhos acessados de forma aleatória.

2 OBJETIVO

Identificar isolados de BAAR por PCR multiplex (m-PCR) e genotipar cepas de *Mycobacterium bovis* por meio de spoligotyping.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agente etiológico

As espécies causadoras da tuberculose em mamíferos pertencem à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* e fazem parte do CMT um grupo de micobactérias intimamente relacionadas, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* (WELLS, 1937), *M. africanum* (CASTETS et al., 1969), *M. canettii* (BROSCH et al., 2002), *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003), *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003) e *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010).

O principal agente de tuberculose entre os animais domésticos e silvestres é *M. bovis*, e para humanos *M. tuberculosis*. *Mycobacterium microti* é patogênico apenas para a roedores e *Mycobacterium africanum* nunca foi isolado no Brasil. *Mycobacterium canetti* está relacionado com a doença em humanos, mas a sua contribuição é incerta na epidemiologia da doença (NIEMANN et al., 2000). *Mycobacterium caprae* foi encontrado primariamente na Espanha relacionado com a doença em cabras (ARANAZ et al., 1999; ARANAZ et al., 2003). Na Europa central, *M. caprae* foi identificado como causa comum da tuberculose bovina (PRODINGER et al., 2005). A doença causada por *M. caprae* não é considerada substancialmente diferente daquela causada por *M. bovis* e os mesmos testes podem ser utilizados para seu diagnóstico (OIE, 2009). *Mycobacterium pinnipedii* foi inicialmente isolado de focas e outros animais marinhos, mas já mostrou-se patogênico para cobaias, coelhos, antas, humanos e, possivelmente, bovinos (COUSINS et al., 2003).

A proximidade genética das espécies do CMT, pode ser verificada pelo alto grau de similaridade em nível de DNA e pela sequência 16s rRNA idêntica, mas diferem enormemente em termos de hospedeiro preferencial, características fenotípicas e patogenicidade (NIEMANN et al., 2000; BROSCH et al., 2002; ARANAZ et al., 2003; GARNIER et al., 2003). A conservação da sequência de 16S rRNA entre as espécies do CMT, tem uma consequência prática importante, pois todas as técnicas desenvolvidas para identificação de determinada espécie podem ser adaptadas às outras espécies do CMT (HADDAD et al., 2004).

As micobactérias são estruturalmente relacionadas às bactérias Gram positivas, mas não se classificam como tal, pois as moléculas ligadas a sua parede

celular são lipídeos, ao invés de proteínas ou polissacarídeos, que frequentemente não retém cristal violeta e aparecem como “fantasmas” após a coloração de Gram (BARRERA, 2007). São bacilos pequenos que medem de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento, não flagelados, não esporulados e não capsulados. Assim como as bactérias dos gêneros *Nocardia* e *Rhodococcus*, 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) (BRASIL, 2006; CORNER, 1994).

A parede celular das micobactérias é complexa, constituída por 60% de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos, e por polipeptídeos. À membrana citoplasmática que delimita a célula micobacteriana se sobrepõe uma camada intermediária de peptidoglicanos e uma camada externa de ácidos micólicos específicos ligados ao açúcar arabinogalactano. O complexo micolilarabinogalactano impermeabiliza a superfície da micobactéria, tornando-a muito resistente a compostos hidrofílicos e à dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes e o seu crescimento (CORNER, 1994).

Os bacilos causadores da tuberculose se mantêm viáveis em ambientes úmidos, ao abrigo da luz solar em estábulos, aviários, pastos e matéria orgânica em estado de putrefação por seis meses até quatro anos, na água por até 12 meses e em produtos de origem animal por até dez anos. As micobactérias são sensíveis ao calor, a pasteurização, a fervura e a luz solar direta em ambiente com pouca umidade. São sensíveis a agentes desinfetantes como fenóis, formol e hipoclorito de sódio, porém a ação desses produtos pode ser prejudicada pela concentração dos mesmos, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica (MORRIS et al., 1994; ROXO, 1997).

3.2 Diagnóstico

O método clínico, embora preconizado como de diagnóstico *in vivo* para bovinos, geralmente é inespecífico e relevante somente nos casos de animais identificados com a doença em estágio avançado (RUGGIEIRO et al., 2007).

Na maioria das vezes a tuberculose tem um curso crônico limitado a apenas um órgão, como o pulmão e linfonodos regionais. O processo é lento e pode ser

cl clinicamente inaparente por um longo período, sendo que alguns animais podem passar toda sua vida sem sintomatologia aparente, mas representam uma fonte de contaminação para o resto do rebanho. Em outros animais a doença provoca broncopneumonia crônica, com tosse e diminuição da capacidade produtiva. Em casos avançados, quando a maior parte dos pulmões está comprometida, há dispneia pronunciada (ACHA; SZYFRES, 2001).

Diagnóstico complementar da tuberculose bovina pode ser realizado por meio de testes diretos, que identificam o agente etiológico no material biológico, e por métodos indiretos, que pesquisam resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico (RUGGIERO et al., 2007).

3.2.1 Teste intradérmico

Um importante método indireto empregado para o diagnóstico da tuberculose bovina é realizado por meio de testes cutâneos que usam extratos antigênicos de proteínas purificadas conhecidas como derivado proteico purificado (do inglês purified protein derivative - PPD), sendo este considerado pela OIE como teste de referência. No Brasil se utiliza dois tipos de PPD sintéticos, o PPD bovino, produzido a partir da amostra AN5 de *M. bovis* e o PPD aviário da amostra D4 de *M. avium*. A reação positiva é esperada em animais que responderam imunologicamente à infecção prévia por *M. bovis*, e é caracterizada por uma resposta de hipersensibilidade tardia onde, no local da inoculação, ocorre edema endurecido resultante do processo inflamatório, da deposição de fibrina e da trombose local, a qual alcança sua maior intensidade por volta de 72 horas após a inoculação do antígeno (MONAGHAN et al., 1994; TIZARD, 1998; BRASIL, 2006).

Essa resposta é mediada por células Th1, que migram para o local da injeção do antígeno, reconhecem os complexos de peptídeo ligados nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (do inglês major histocompatibility complex - MHC) de classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos e liberam citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α e TNF- β . As citocinas estimulam a expressão de moléculas de adesão no endotélio e aumentam a permeabilidade do vaso sanguíneo local, permitindo que o plasma e as células entrem no local, o que provoca aumento de volume visível. Cada uma destas fases

leva várias horas e por isso a resposta só aparece 24-48 horas após a injeção (JANEWAY et al., 2008).

Há bovinos que, embora infectados, não reagem ao teste intradérmico devido a supressão do sistema imunitário (dessensibilização) induzida por inoculações sucessivas de PPD ou aplicação de altas concentrações do antígeno. É um fenômeno de curta duração e cessa quando a população de linfócitos T é restabelecida. Reações falso-negativas também podem ocorrer em vacas submetidas ao teste intradérmico próximo ao parto ou em animais subnutridos. Em animais com tuberculose generalizada, ou em estágios finais da doença, há excesso de antígeno circulante que induz uma imunossupressão específica e, por consequência, inibição da produção de citocinas necessárias à ativação de macrófagos participantes da reação de hipersensibilidade tardia (OIE, 2009).

A resposta de hipersensibilidade tardia não se desenvolve antes de três a seis semanas pós-infecção. Assim, se um rebanho/animal é suspeito de ter contato muito recente com animais infectados, o teste deverá ser adiado a fim de reduzir a probabilidade de resultados falso-negativos (OIE, 2009).

Os testes cutâneos que utilizam PPD como antígenos podem ser simples ou comparativo. Os testes simples empregam PPD bovino e são utilizados como prova de triagem, o teste da prega caudal (TPC) exclusivamente em rebanhos de corte e o teste cervical simples (TCS) como prova de rotina no gado leiteiro. Como prova confirmatória se utiliza o teste cervical comparativo (TCC) que emprega PPD bovino e PPD aviário. Esse último detecta reações inespecíficas em animais negativos provocadas por micobactérias do Complexo *M. avium-intracellulare* e outras ambientais que dificultam o diagnóstico da tuberculose bovina (BRASIL, 2006).

Em decorrência da sua boa especificidade diagnóstica, o TCC também é preconizado como teste de rotina para estabelecimentos onde reações inespecíficas são comuns e para aqueles certificados como livres (BRASIL, 2006).

3.2.2 Detecção de interferon gama plasmático

O ensaio de interferon gama (IFN- γ) é aplicado como um exame complementar no diagnóstico *ante mortem* da tuberculose bovina. Ele avalia a resposta imune celular à antígenos micobacterianos assim como os testes

intradérmicos. Amostras de sangue total são incubadas com antígenos micobacterianos e as células imunes presentes no sangue respondem aos antígenos liberando uma cascata de sinais químicos, principalmente IFN- γ (ALLEN; SKUCE; McDOWELL, 2011).

O ensaio para detecção de IFN- γ foi desenvolvido na Austrália no final de 1980, e validado após a erradicação da tuberculose bovina naquele país (WOOD et al., 1991). Passou a ser recomendado pela OIE como exame complementar em casos de comércio internacional de bovinos. Tem sido amplamente utilizado em todo o mundo, quer em série com o teste intradérmico, quando a sua utilização é para aumentar a especificidade do diagnóstico, quer em paralelo com o teste intradérmico, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção da doença (POLLOCK et al., 2005).

O ensaio detecta a liberação de IFN- γ de linfócitos sensibilizados durante 16-24 horas de incubação com antígenos específicos, PPD bovino (PPDb) e PPD aviário (PPDa) (WOOD et al., 1990). Ao final se compara a produção de IFN- γ estimulada pelos PPD. A detecção de IFN- γ bovino é realizada por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) do tipo sanduíche. O resultado do teste é baseado em densidade óptica (OD) e este é calculado subtraindo-se a reatividade ao PPDb do PPDa (RYAN et al., 2000; COAD et al., 2007).

O ensaio para detecção de IFN- γ tem vantagens em relação aos testes intradérmicos, como melhor sensibilidade quando comparado ao TCC; pode ser repetido no mesmo animal de imediato; os animais são manejados uma única vez, e a interpretação do teste pode ser considerada menos subjetiva. Contudo, há também limitações significativas em comparação com os testes intradérmicos, como menor especificidade, particularmente em animais jovens; a necessidade de rápido processamento laboratorial após a coleta do sangue; habilidade laboratorial e custo significativo do kit comercial disponível (ALLEN; SKUCE; McDOWELL, 2011).

3.2.3 Testes sorológicos

As respostas por anticorpos às espécies do CMT são geralmente consideradas silenciosas na maioria dos animais, pois a resposta imune predominante é a do tipo celular. Classicamente, em seguida da infecção o animal

monta uma resposta imune mediada por células (IMC), que pode com o tempo declinar ou ser substituída pela resposta mediada por anticorpos (POLLOCK E NEILL, 2002; WELSH et al., 2005). Essa resposta pode estar associada a animais anérgicos que embora doentes não respondem aos testes de diagnóstico baseados na IMC (teste intradérmico e IFN- γ). Esse perfil é relacionado com a fase avançada da doença (WELSH et al., 2005; SILVA et al., 2001; POLLOCK; NEILL 2002; LILENBAUM; FONSECA, 2006). Assim, a resposta por meio de anticorpos pode ser útil como um marcador do avanço da doença e, por conseguinte, de animais mais susceptíveis a disseminar o agente (HUSSAIN et al., 2001).

Os testes sorológicos por meio de ELISA possuem vantagens como sua simplicidade, a possibilidade de processamento de grande número de amostras e automação na leitura de resultados. Entretanto, a sensibilidade é limitada principalmente por causa do desenvolvimento tardio e irregular da resposta imune humoral durante o curso da doença (LILENBAUM, 1999; LILENBAUM et al., 2011; FENTAHUN; LUKE, 2012).

A combinação de testes que detectam IMC com aqueles que detectam a imunidade humoral tem como vantagem melhorar a cobertura de diagnóstico da tuberculose bovina, uma vez que animais anérgicos podem ser identificados (LILENBAUM et al., 2011; MEDEIROS et al., 2012).

Uma ampla variedade de testes sorológicos tem sido testada, no entanto é difícil fazer comparações entre eles pois muitos têm usado diferentes combinações de alvos antigênicos para medir a resposta por anticorpos, além de diferentes planejamentos amostrais. Contudo tem havido um esforço concentrado por vários grupos de pesquisa para identificar potenciais alvos antigênicos específicos de *M. bovis* para ensaios de anticorpos (SCHILLER et al., 2010).

Testes sorológicos com os antígenos do CMT e antígenos recombinantes conferem aumento na especificidade e a identificação rápida de rebanhos infectados, que podem ser testados depois individualmente por meio do teste intradérmico. A otimização dos testes de ELISA tem sido possível por meio da combinação de diferentes antígenos para a detecção de anticorpos contra *M. bovis*, incluindo as proteínas MPB70 e MPB83 (McNAIR et al., 2001; MASSASI et al., 2013; MEDEIROS et al., 2012). As proteínas recombinantes p27 e MPB70 quando usadas isoladas também mostraram-se promissoras em ELISA (FARIAS et al., 2012).

Quando comparados ao TCC, ELISA com as proteínas recombinantes ESAT-6, MPB-83 e PE5 obtiveram boa concordância (SOUZA et al. 2012).

3.2.4 Inspeção durante o abate

No Brasil, a inspeção de carcaças é regulamentada pelo Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA), do MAPA, segundo o Decreto de nº 1.283, de 18 de março de 1952, alterado pelos decretos: nº 1.255, de 25 de junho de 1962; nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, nº 1.812, de fevereiro de 1996 e pelo decreto nº 2.224, de 4 de julho de 1997 (BRASIL, 2007).

O exame *post mortem* realizado durante o abate pelo serviço de inspeção de produtos de origem animal é uma etapa essencial no diagnóstico da tuberculose bovina em virtude do seu papel tanto na proteção ao consumidor, com o objetivo de tornar seguro o consumo dos alimentos inspecionados, como também na atuação da vigilância epidemiológica da doença. A presença de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, geralmente caracterizadas por nódulos granulomatosos, constitui diagnóstico presuntivo (BRASIL, 2006; KANTOR; RITACCO, 2006). Tais lesões são mais frequentemente observadas nos linfonodos, especialmente da cabeça e tórax, pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio, embora possam ser encontradas em qualquer tecido do corpo (OIE, 2009).

Cabe ressaltar que animais reagentes ao teste intradérmico podem não apresentar lesões visíveis durante o exame *post mortem*; isso não significa, porém, que se trata de reação falso-positiva. As lesões podem estar em estágios iniciais de evolução, ou simplesmente não terem sido encontradas durante a inspeção de rotina (BRASIL, 2006).

Fragments de tecido com ou sem lesões sugestivas de tuberculose podem ser enviados para exame histopatológico ou para o isolamento do agente por métodos bacteriológicos (OIE, 2009).

3.2.5 Exame bacteriológico

Quando comparadas aos demais padrões bacteriológicos, as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, particularmente *M. bovis*, crescem lentamente em meio de cultura e podem consumir 90 dias ou mais. O isolamento do agente infeccioso constitui diagnóstico preliminar da tuberculose. O sucesso na recuperação de micobactérias em cultura, a partir de tecidos de animais suspeitos da doença, depende de uma série de procedimentos que devem ser realizados antes do cultivo e incluem homogeneização e descontaminação da amostra, além da utilização de meios de cultura adequados que contenham os substratos necessários para o crescimento das micobactérias e substâncias que inibam o crescimento de contaminantes (OIE, 2009; CORNER et al., 2012). É importante considerar que a quantidade de tais contaminantes pode variar de acordo com o tipo de amostra, a forma como foi coletada e preservada, e com o tempo de transporte para o laboratório (CORNER, 1994). Além disso, o fato de algumas amostras conterem apenas um pequeno número de bacilos vivos viáveis também pode comprometer o sucesso do isolamento (ARAÚJO et al., 2005).

Para processar amostras para a cultura o tecido é homogeneizado e descontaminado com um alcaloide (hidróxido de sódio), um ácido (ácido oxálico) ou um detergente (cloreto de hexadecilpiridínio). A mistura do homogeneizado com o descontaminante ácido ou alcalino é incubada e, em seguida, neutralizada. A suspensão é centrifugada, o sobrenadante é descartado e o sedimento é usado para o cultivo (BRASIL, 2005; OIE, 2009).

A descontaminação de amostra tem como alvo inativar outras bactérias que possam estar presentes na amostra, a fim de evitar seu rápido crescimento e a exaustão de nutrientes do meio, tornando o crescimento de *M. bovis* inviável. Os produtos utilizados nos procedimentos de descontaminação não devem ser agressivos para as micobactérias e, ao mesmo tempo, devem ser capazes de inativar a microbiota acompanhante. Esses fatores associados ao grau de contaminação da amostra são responsáveis pela sensibilidade do método de isolamento (AMBROSIO et al., 2008).

Um dos métodos mais utilizados de descontaminação de amostras teciduais de animais é o método de Petroff, considerado sensível e econômico. Esse método

utiliza hidróxido de sódio (NaOH) 4%, solução de vermelho fenol 0,2%, ácido clorídrico 1N e posterior adição de solução neutralizadora (CPZ, 1972; ROSEMBERG et al., 1990; BRASIL, 2008).

Para o isolamento primário, o sedimento obtido da centrifugação do homogeneizado descontaminado geralmente é inoculado em meios de cultura a base de ovo e amido, enriquecidos com asparagina e contendo verde malaquita para inibir contaminantes. O meio Lowenstein Jensen utiliza glicerol como fonte de energia e é usado para o isolamento da espécie *M. tuberculosis*. Para *M. bovis* o Stonebrink é o meio mais recomendado, pois essa espécie tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor quando o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio (CORNER, 1994; MARCONDES et al., 2006).

As culturas são incubadas por um período mínimo de 90 dias em tubos hermeticamente fechados para evitar a dessecação. Durante o período de incubação, buscam-se sinais de crescimento macroscópico, em intervalos semanais. Em meios de cultura a base de ovos contendo piruvato de sódio, é típico o crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo pálido, com bordas irregulares e superfície granular. As micobactérias também crescem em meios à base de agar enriquecidos com soro ou sangue, como o meio de Middlebrook modificado ou 7H11 e o meio agar sangue tuberculose ou B83. Nesses as colônias são delgadas, rugosas e planas, com elevação central e de coloração branca (CORNER, 1994).

Quando o crescimento é visível, são preparados esfregaços corados pela técnica de Ziehl Neelsen (OIE, 2009) para verificação da presença de BAAR, que quando corados pela fucsina a quente resistem á descoloração com álcool-ácido. Esta propriedade parece decorrer da firme fixação da fucsina aos lipídeos (ácidos micólicos), que constituem cerca de 60% da parede celular de micobactérias. Após coloração pela fucsina de Ziehl, procede-se à coloração de fundo com solução de azul de metileno ou outro contracorante (BRASIL, 2006; CORNER, 1994).

Conforme o PNCEBT análises bacteriológicas completas são necessárias para algumas situações, dentre estas, confirmação da presença de infecção tuberculosa em bovinos de um país ou região onde não foi comprovada anteriormente; estudo de animais positivos ao teste tuberculínico, nos quais não se

observaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose; confirmação da presença de infecção em animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade considerada livre da doença; pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção sanitária post-mortem de animais provenientes de unidades de criação monitoradas para tuberculose; pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal; e quando da realização de necropsia de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose (BRASIL, 2006).

O modelo característico de crescimento e a morfologia colonial em meios de cultura podem formular um diagnóstico preliminar de infecção por *M. bovis*. Tais colônias podem ser identificadas por meio de provas bioquímicas ou por técnicas de biologia molecular (OIE, 2009).

3.2.6 Identificação molecular

Uma combinação eficiente para o diagnóstico direto da tuberculose bovina é o isolamento do agente etiológico por meio da bacteriologia clássica, seguido da identificação por métodos moleculares (TELENTI et al., 1993; RODRÍGUEZ et al., 1995; VITALE et al., 1998). A reação em cadeia da polimerase (do inglês polymerase chain reaction - PCR) e suas variantes (nested-PCR, PCR multiplex, PCR em tempo real) quando aplicadas na identificação de micobactérias mostram-se rápidas, sensíveis e específicas (LIEBANA et al., 1995; WARDS et al., 1995; RORING et al., 2000).

A escolha correta dos oligonucleotídeos é um dos pontos críticos para o sucesso da PCR no diagnóstico da tuberculose (SAKAMOTO et al., 1999). Vários sistemas de PCR foram desenvolvidos para a detecção de espécies do CMT. O sistema mais frequentemente usado é baseado no emprego dos oligonucleotídeos INS-1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3') e INS-2 (5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3') que amplificam um fragmento de 245 pares de base (pb) do elemento IS6110 (HERMANS et al., 1990; THIERRY et al., 1990; VAN EMBDEN et al., 1993).

Telenti et al. (1993) desenvolveram uma técnica baseada em PCR seguida de análise de fragmentos de restrição denominada PCR-PRA (do inglês PCR-restriction fragment length polymorphism analysis) do gene *hsp65* presente em diferentes espécies de micobactérias. Essa técnica envolve uma PCR com oligonucleotídeos Tb11 (5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT3') e Tb12 (5'CTTGTCGAACCGCATACCCT3'), que amplifica um fragmento de 439 pb comum ao gênero *Mycobacterium*, seguida de digestão por enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* que gera fragmentos polimórficos, cuja combinação possibilita a diferenciação de espécies por meio de chaves de classificação.

Rodríguez et al. (1995) desenvolveram os oligonucleotídeos JB-21 (5' TCGTCCGCTGATGCAAGTTGC 3') e JB-22 (5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3') que acreditavam ser espécie-específico (*M. bovis*) para amplificação de um fragmento genômico de 500 pb contido na região RvD1Rv2031c. Em estudos posteriores os mesmos autores observaram que alguns isolados da espécie estreitamente relacionada, *M. tuberculosis*, também apresentavam o fragmento de 500 pb e podiam ser identificados por esses oligonucleotídeos (RODRÍGUEZ et al., 1999). Entretanto, o benefício do ensaio não deve ser diminuído, uma vez que indica a presença do agente infeccioso do CMT (CARDOSO et al., 2009).

3.2.7 Epidemiologia molecular

Tradicionalmente, para o estudo da epidemiologia da tuberculose, as informações sobre o contato social de pessoas e o histórico da doença do paciente costumava ser a única base relevante para a elucidação da transmissão da infecção tuberculosa. Era difícil concluir se um isolado de BAAR a partir de diferentes pacientes era proveniente de uma fonte comum de infecção ou não. A tipagem de cepas de *M. tuberculosis* tornou-se possível com base na visualização dos múltiplos *loci* de uma sequência de inserção IS6110, um fragmento genômico relativamente estável existente em região específica do genoma. A variabilidade do número de cópias e os locais de IS6110 presentes no genoma permitem a tipificação de cepas do CMT. A análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês restriction fragment length polymorphism - RFLP) depende da diversidade de padrões de qualquer marcador polimórfico encontrado no genoma de uma cepa.

Essa técnica baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição, denominadas endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos, que são então separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA (COLLINS, 2011; HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004; THIERRY et al., 1990).

O método de RFLP possui excelente poder discriminatório quando se investiga a espécie *M. tuberculosis*, pois o número de cópias da sequência de inserção IS6110 é geralmente bastante elevado, maior que vinte e cinco cópias (DEVALLOIS et al., 1998). Porém, quando testada em isolados de *M. bovis* apresenta uma capacidade pequena de discriminação, já que a maioria deles possui no máximo oito cópias desse fragmento (ARANAZ et al., 1996; COLLINS, 2011; COUSINS; DAWSON, 1999; DEVALLOIS et al., 1998, HADDAD; MASSELOT; DURANT, 2004; KREMER et al., 1999).

RFLP tornou-se padrão-ouro para estudos de epidemiologia molecular, tais como a estimativa do grau de transmissão recente, a identificação de contaminação cruzada no laboratório, a identificação de focos e distinção entre reinfecção e recaída. Entretanto, após a conclusão do genoma da estirpe H37Rv de *M. tuberculosis*, alguns dos isolados clínicos foram completamente sequenciados. Isso levou a comparação *in silico* do genoma e identificou vários marcadores genômicos que podem esclarecer tanto a epidemiologia como a análise evolutiva da população de *M. tuberculosis*. Entre esses marcadores, o método de tipagem discriminatório denominado unidades repetitivas micobacterianas (do inglês mycobacterial interspersed repetitive unit - MIRU) baseado no estudo de *loci* contendo números variáveis de repetições em sequência (do inglês variable number tandem repeats - VNTR) foi proposto como um método promissor que pode discriminar espécies do CMT e, em muitos casos, estimar a transmissão e a identificação de linhagens genéticas (SUPPLY et al., 2006; McLERNON et al., 2010). A tipagem MIRU-VNTR visa *loci* genéticos que estão distribuídos por todo o genoma e contém uma variação na quantidade de sequências repetidas. O polimorfismo nos *loci* pode decorrer tanto da mudança na sequência dos nucleotídeos como da variação no número de unidades repetidas. Uma vez determinado o perfil de alelos para cada cepa, os dados são analisados empregando um aplicativo web MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>). Esse serviço permite aos usuários acesso livre para

comparar perfis alélicos de isolados de micobactérias de diferentes regiões do mundo depositados no banco de dados que representa as principais linhagens do CMT (ALLIX-BEGUEC et al., 2008; WENIGER et al., 2010).

Estudos populacionais em ambientes com características epidemiológicas representativas de muitos países desenvolvidos mostraram que a tipagem MIRU-VNTR tem sido mais eficiente do que a ferramenta padrão-ouro RFLP no estudo da transmissão da tuberculose (COLLINS, 2011). Um dos potenciais do MIRU-VNTR é a sua aplicabilidade para a criação do banco de dados de genótipos de cepas do CMT em escala mundial, o que é essencial para bons serviços de vigilância epidemiológica e controle de doenças (HADDAD; MASSELOT; DURAND, 2004). Outra vantagem desse método é a sua utilização para a análise filogenética (WIRTH et al., 2008; OELEMANN et al., 2011). A principal desvantagem da técnica MIRU-VNTR é a necessidade de vários oligonucleotídeos com diferentes protocolos de amplificação para análise de uma única amostra (Rodriguez et al., 2004).

Outro método útil para detectar e discriminar simultaneamente bactérias do CMT em amostras clínicas é o emprego de spoligotyping (spacer oligotyping). A técnica baseia-se na amplificação por PCR de um único *locus* de repetição direta (do inglês Direct Repeat - DR) altamente polimórfico contendo múltiplas sequencias de repetições diretas (sequencias DR) intercaladas com sequências espaçadoras não repetitivas que podem conter de 34 a 41 pb, presente exclusivamente no genoma de micobactérias do CMT (HERMANS et al., 1991; KAMERBEEK et al., 1997). O polimorfismo entre isolados de micobactérias é comprovado pela ausência ou presença de um ou mais espaçadores (ARANAZ et al., 1996) e também está relacionado ao número de regiões DR (HADDAD et al., 2004). O nível de diferenciação por spoligotyping é menor em comparação ao RFLP para cepas possuindo cinco ou mais cópias de IS6110, mas mais elevado para as com menos de cinco cópias. Assim spoligotyping é o método mais indicado para genotipagem de cepas de *M. bovis*, que geralmente contêm apenas uma ou duas cópias de IS6110. Cepas de *M. bovis* podem ser reconhecidas pela ausência de hibridação com espaçadores 39-43 (KAMERBEEK et al., 1997).

Posteriormente à PCR é feita a hibridação em membrana que contenha oligonucleotídeos 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 combinação homóloga entre as DR próximas ou distantes e também em função do rearranjo ocorrido devido a presença do transposon, que são regiões do DNA que podem se transferir para outra região do genoma, deixando ou não uma cópia no local onde estavam (ARANAZ et al., 1996).

As análises e comparações genéticas e epidemiológicas dos diferentes espoligotipos gerados são realizadas por meio de um banco de dados internacional (SpolDB4) que compartilha 1.939 perfis, representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 141 países (BRUDEY et al., 2006).

Além de detectar e discriminar espécies do CMT, o spoligotyping é capaz de elucidar especificidades geográficas entre os espoligotipos, de modo que alguns isolados agrupados em famílias estejam relacionados a uma determinada população, região geográfica e até a própria história da dispersão da tuberculose no mundo (SOLA et al., 1999).

A discriminação molecular de isolados de *M. bovis* por meio de spoligotyping Constitui-se em uma ferramenta valiosa para dar apoio e racionalidade aos sistemas de vigilância para detecção de tuberculose bovina, sistema este de grande importância para as áreas de baixa prevalência de focos, como parece ser grande parte do território brasileiro (RODRIGUEZ et al. 2004).

A oportunidade de combinar informações diagnósticas rápidas e dados de epidemiologia molecular representa um avanço importante no controle da tuberculose. Dados epidemiológicos, caracterização molecular a partir de tecido de bovinos e a geolocalização dos casos, podem contribuir para o entendimento da distribuição da tuberculose bovina e auxiliar no desenvolvimento de estratégias para conter sua disseminação. Em vista disso, este estudo propôs isolar, identificar e genotipar micobactérias a partir de tecidos provenientes de bovinos positivos no teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose no Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS

ACHA P. N.; SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Organización Panamericana de la Salud**, v. 3, 3 ed, p. 271, Washington, D.C, 2001.

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P.N.; MICHEL, A.L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; GEYVAN PITTIUS, N. C. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296-9, 2010.

ALLEN, A. R., SKUCE, R.A.; MCDOWELL, S. W. J. Bovine TB (TB): a review of badger-to-cattle transmission. 2011. Disponível em: <<http://www.dardni.gov.uk>>. Acesso em: 2 fev. 2014.

ALLIX-BÉGUEC, C.; HARMSSEN, D.; WENIGER, T.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, 2008.

ALFREDSEN, S.; SAXEGAARD, F. An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. **The Veterinary Record**, v. 131, n.3, p. 51-53, 1992.

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.1; NETO, J. S. F.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONALEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EBDEN, J. D. A.; COUSINS, D. Spacer oligonucleotide typing of *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.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLAZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 1263-1273, 1999.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1785-1789, 2003.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; JORGE, K. D. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.

ÁVILA, L. N.; BAHIANSE, L. C.; PEREZ, A. M., GONÇALVES, V. S. P.; BAVIA, M. E.; NETO, J. S. F.; FERREIRA, F.; TELLES, E.; DIAS, R.; AMAKU, M. Prevalência e análise espacial da tuberculose bovina no estado da Bahia. In: 1º Encontro Nacional de Epidemiologia Veterinária, 2012, São Paulo. Resumos. São Paulo: USP, 2012. p. 66.

AZAMBUJA, A. D. **Estratégias de diagnóstico da tuberculose bovina.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

BARRERA, L. **The Basics of Clinical Bacteriology.** In: Palomino, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. From basic science to patient care. Tuberculosis Textbook.com 2007, p. 93-112, 2007. Disponível em: <<http://www.tuberculosistextbooks.com/tuberculosis2007.pdf>>. Acesso em: 1 out. 2013.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose.** Rio de Janeiro, 3 ed., p. 240, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT).** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **RIISPOA e outras legislações de interesse do DIPOA.** Decreto n. 30.691 de 29 de março de 1952. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, p. 186-190, 2008.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.6, p.3684-3689, 2002.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. M.; A. GORI, AL-HAJJOJ, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUNO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J. T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; GARCIA DE VIEDMA, D.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H. M.; GUTTIEREZ, M. C.; HAWKEY, P. M.; VAN HELDEN, P. D.; KADIVAL, G. V.; KREISWIRTH, B. N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S. P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; HO, M. L.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAIA, O.; NGEOW, Y. F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M. L.; RUSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I. G.; SINGH, U. B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R. A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E. M.; SUFFYS, P. N.; TORTOLI E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T. C.; WARREN, R. M.; YAP, S. F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BioMed Central Microbiology**, v. 6, p. 1-17, 2006.

CARDOSO, M. A.; CARDOSO, R. F.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. D.; LEITE, C. Q. SANTOS, A. C.; SIQUEIRA, V. L.; OKANO, W.; ROCHA, N. S.; LONARDONI, M. V. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. **Zoonoses Public Health**, v. 56, n. 8, p. 465-470, 2009.

CASTETS, M.; RIST, N.; BOISVERT, H. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. **Médecine d'Afrique Noire**, v. 16, p. 321-322, 1969.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Diagnóstico de laboratório de la tuberculosis animal (Nota tecnica, 6). Centro Panamericano de Zoonosis: Buenos Aires, 1972.

COAD, M.; HEWINSON, R. G.; CLIFFORD, D.; VORDERMEIER, H. M.; WHELAN, A. O. Influence of skin testing and blood storage on interferon- γ production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*, **The Veterinary Record**, v. 160, n. 19, p. 660-662, 2007.

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

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, 2012.

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximizing the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 162-171, 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. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REBROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D. RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

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

FARIAS, T. A.; ARAÚJO, F. R.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S.G.; RAMOS, C. N. A.; SOUZA, I. I. F.; AZAMBUJA, A.; SOARES, C. O.; SILVA, M. R.; PELLEGRIN, A. O. Elisa based on recombinant mpb70 and p27 for detection of antibodies against: *Mycobacterium bovis*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, p. 155-162, 2012.

FIGUEIREDO, S. M.; ROCHA, V. C. M.; HIGINO, S. S. S.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 712-716, 2010.

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.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Microbiology**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

GOYAL, M.; SAUNDERS, N. A; VAN EMBDEN, J. D.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragments length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 647-651, 1997.

GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; SOOLINGEN, D.; VAN ERRTBDEN, J. D. A. 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.

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

HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R.; MCADAM, R A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2051-2058, 1990.

HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; DE HAAS, P. E.; DALE, J. W.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG isolated in a hot-spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strain. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2695-2705, 1991.

HUSSAIN, R.; SHIRATSUCHI, H.; PHILLIPS, M.; ELLNER, J.; WALLIS, R.S. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes- implications for pathogenesis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 123, p. 210-218, 2001.

INDERLIED, C. B.; KEMPER, C. A.; BERMUDEZ, L. E. The *Mycobacterium avium* complex. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p. 266-310, 1993.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P. L.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiology**. New York and London: Garland Science, 2008.

JORGE, K. S. G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária/ FIOCRUZ) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN 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 Clinical Microbiology**, v. 35, p. 907-914, 1997.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 11-118, 2006.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HASSA, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

LIEBANA, E.; ARANA, A.; MATEOS, A.; VILA FRANCA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J. C.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 33-36, 1995.

LILENBAUM, W. O uso do ELISA para o diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil: uma possibilidade interessante? **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 28-31, 1999.

LILENBAUM, W.; FONSECA, L. The use of ELISA as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 256-261, 2006.

LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; MEDEIROS, L. Use of MPB70 ELISA as a complementary test for bovine TB in the field in Brazil. **Veterinary Record**, v. 168, p. 167-168, 2011.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.

MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A.; BENITES, N. R.; MORAIS, Z. M.; ROXO, E.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. L. P. C.; PINHEIRO, S. R. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MCNAIR, J.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 53, p. 365-371, 2001.

MARASSI, C. D.; MEDEIROS, L.; FIGUEIREDO, E.; FONSECA, L. S.; DUARTE, R.; PASCHOALIN, V.; OELEMANN, W. M. R.; LILENBAUM, W. A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 15-20, 2013.

Mc LERNON, J.; COSTELLO, E.; FLYNN, O.; MADIGAN, G.; RYAN, F. 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, 2010.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; EDUARDO, E. S.; LEITE, J.; FERREIRA, A. M. R.; LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n. 2, p. 15-20, 2012.

MICHEL, A.L.; MULLER, B.; VAN HELDEN; P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 371-378, 2010.

MONAGHAN, M.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, D.; KAZDA, J. D.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, n. 40, p. 11-124, 1994.

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

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RUTSCH-GERDES, S. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, 152-157, 2000.

NESPOLI, J. M. B. Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OELEMANN, M.C.; GOMES, H. M. ; WILLERY, E. ; POSSUELO, L.; BATISTA, L. K. V.; ALLIX-BÉGUEC, C.; LOCHT, C.; GOGUET DE LA SALMONIÈRE, Y. O.; GUTIERREZ, M. C.; SUFFYS, P.; SUPPLY, P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. 1-10, e.18256, 2011.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 5 ed. Paris: OIE, 2009.

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

PRODINGER, W. M.; BRANDSTÄTTER, A.; NAUMANN, L.; PACCIARINI, M.; KUBICA, T.; BOSCHIROLI, M. L.; ARANAZ, A.; NAGY, G.; CVETNIC, Z.; OCEPEK, M.; SKRYPNYK, A.; ERLER, W.; NIEMANN, S.; PAVLIK, I.; MOSER, I. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4984-4992, 2005.

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

RODRÍGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DEL PROTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v. 141, p. 2131-2138, 1995.

RODRÍGUEZ, J. G.; FISSANOTI, J. C.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A. Amplification of 500-basepair fragment from isolates of *Mycobacterium bovis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p. 2330-2332, 1999.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. L.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de *spoligotyping*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 1, p. 277-282, 2004.

RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by *spoligotyping*. **Veterinary Microbiology**, v.74, p. 227-236, 2000.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B.; PAULA, A. Tuberculose. *In*: Tarantino, A. B. **Doenças pulmonares**. 3. ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 233-297, 1990.

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

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIR, A V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose Bovina: Alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

RYAN, T. J.; BUDDLE, B. M.; DE LISLE, G. W. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 57-61, 2000.

SAKAMOTO, S. M. et al. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, n. 2, p. 44 - 58, 1999.

SCHENK, M. A. M.; SCHENK, J. A. P. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros frigoríficos do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). **A Hora Veterinária**, v. 1, n. 5, p. 28-31, 1982.

SCHILLER, I.; VORDERMEIER, H. M.; WATERS, W. R.; KYBURZ, A.; CAGIOLA, M.; WHELAN, A.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; MEIJLIS, J.; CARTER, C.; GORDON, S.; EGNUNI, T.; HARDEGGER, R.; MARG-HAUFE, B.; RAEBER, A.; OESCH, B. Comparison of tuberculin activity using the interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Veterinary Record**, v. 167, p. 322-326, 2010.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p.111-117, 2001.

SILVA, M. C. P. **Epidemiologia e fatores de risco de tuberculose bovina no Estado do Paraná**. 2012. 84 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

SOLA, C.; DEVALLOUIS, A.; HORGEN, L.; MAISETTI, J.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; RASTOGI, N. Tuberculosis in the Caribbean: Using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, n. 3, 1999.

SOUZA, I. I. F.; MELO, E. S. P.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S. G.; VIDAL, C. E. S.; SILVA, A. S.; SILVA, M. R.; PELLEGRIN, A. O.; ARAÚJO, F. R. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. **SpringerPlus**, v. 1, n. 77, 2012.

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. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Tradução Paulo Marcos Agria de Oliveira. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VICENT-LÉVY-FRÉBAUT, V.; NGUYEN, S.; GUEDSON, J. L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.

VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R.; BRAGA, M. J. Determinantes do Uso de Medidas Sanitárias de Controle da Brucelose e Tuberculose Bovina. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 215-232, 2011.

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

VAN INGEN, J.; RAHIM, Z.; MULDER, A.; BOEREE, M. J.; SIMEONE, R.; BROSCHE, R.; VAN SOOLINGEN, D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 653-655, 2012.

VENDRAME, F. B. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Rondônia**. 2013. 40 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1050-1055, 1998.

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

WELLS, A. Q.; OXON, D. M. Tuberculosis in wild voles. **The Lancet**, v. 229, p. 1221, 1937.

WELSH, M. D.; CUNNINGHAM, R. T.; CORBETT, D. M.; GIRVIN, R. M.; MCNAIR, J.; SKUCEM R. A.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, v. 114, p. 101-111, 2005.

WENIGER, T.; KRAWCZYK, J.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S.; HARMSSEN, D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. w326-w331, 2010.

WIRTH, T.; HILDEBRAND, F.; ALLIX-BEGUEC, C.; WOLBELING, F.; KUBICA, T.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; RUSCH-GERDES, S.; LOCHT, C.; BRISSE, S.; MEYER, A.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, e1000160, 2008.

WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of the g-interferon. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 46-49, 1990.

WOOD, P. R.; CORNER L. A.; ROTHEL, J. S.; BALDOCK, C.; JONES, S. L.; COUSINS, B. D.; McCORMICK, B. S.; FRANCIS, B. R.; CREEPER, J.; TWEDDLE, N. E. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, p. 286-290, 1991.

Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* de bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil¹

Daniela de O. Cazola^{2*}; Klaudia dos S. G. Jorge²; Martín J. Zumárraga³; Antônio F. Souza-Filho⁴; Flábio R. Araújo⁵; Ana Luiza A. R. Osório²

ABSTRACT.- Daniela de Oliveira Cazola²; Klaudia dos S. G. Jorge²; Martín J. Zumárraga³; Antonio F. Souza-Filho⁴; Flábio R. Araújo⁵; Ana Luiza Alves Rosa Osório². [Identification and genotyping of *Mycobacterium bovis* from positive cattle in skin test for tuberculosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil.] Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* de bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00. Laboratório de Micobacteriologia e Biologia Molecular da FAMEZ/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Muller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil. E-mail: danicazola@gmail.com

In this study was performed spoligotyping to genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates obtained from tissues of cattle positive in comparative intradermal tuberculin test (CITT) in the state of Mato Grosso do Sul. Tissues of 13 positive cattle from different municipalities of the state were cultured in Stonebrink medium. The resulting colonies were subjected to Ziehl-Neelsen and all isolates showed staining characteristics of AFB. The 13 isolates of AFB were identified by multiplex PCR (mPCR) assay. The hsp65 gene was targeted for the identification of *Mycobacterium* spp, the IS6110 insertion sequence was targeted for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and RvD1Rv2031c gene was explored for the detection of *Mycobacterium bovis*. Spoligotyping assay was performed for genotyping of micobacterial isolates. Of the 13 cattle, seven had at least one lesion suggestive of tuberculosis in retropharyngeal, parotid and lung lymph nodes or lung, and six showed no lesions suggestive of the disease. In the mPCR 11 out of the 13 isolates (84.6%) were positive for *Mycobacterium* spp., 8/13 (61.5%) were positive for the MTC and 7/13 (53.8%) positive for *M. bovis*. Based on spoligotyping, eight isolates were grouped into three different groups of genotypes and one isolate showed an orphan type. Four isolates showed spoligotype pattern SB0121, two isolates were SB1145, two isolates were SB0881 and one isolate was SB0140. Spoligotyping showed a genetic diversity among isolates present in the state of Mato Grosso do Sul, and SB0121 predominant profile.

INDEX TERMS: molecular identification, molecular epidemiology, spoligotyping, bovine tuberculosis.

RESUMO.- Neste estudo realizou-se genotipagem de isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de amostras de tecidos de bovinos positivos no teste cervical comparativo (TCC) para tuberculose em Mato Grosso do Sul, por meio da técnica de spoligotyping. Tecidos de 13 bovinos positivos, oriundos de diferentes municípios do estado, foram cultivados em meio de Stonebrink. As colônias resultantes foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen e todos os isolados apresentaram características tintoriais de BAAR. Os 13 isolados de BAAR foram identificados por PCR multiplex (mPCR). O gene hsp65 foi alvo para identificação de *Mycobacterium* spp, a sequência de inserção IS6110 foi alvo para identificação de complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e o gene RvD1Rv2031c foi explorado para detecção de *Mycobacterium bovis*. Os isolados micobacterianos foram genotipados pela técnica de spoligotyping. Dos 13 bovinos, sete tinham pelo menos uma lesão sugestiva de tuberculose em linfonodos retrofaríngeos, parotídeos e pulmonares ou no pulmão, e em seis não foram encontradas lesões visíveis sugestivas da doença. Na mPCR 11/13 (84,6%) isolados foram positivos para *Mycobacterium* spp; 8/13 (61,5%) positivos para CMT e 7/13 (53,8%) positivos para *M. bovis*. Com base no spoligotyping oito isolados de BAAR foram agrupados dentro de três diferentes agrupamentos de genótipos e uma amostra remanescente apresentou perfil único, sendo quatro isolados com padrão de spoligotipo SB0121, dois SB1145, dois SB0881 e um SB0140. A técnica de spoligotyping demonstrou que há diversidade genética entre os spoligotipos presentes no estado de Mato Grosso do Sul, embora predomine o perfil SB0121.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: identificação molecular, epidemiologia molecular, spoligotyping, tuberculose bovina.

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em...

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Laboratório de Micobacteriologia e Biologia Molecular. Av. Senador Filinto Muller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

³ Instituto de Biotecnologia, CICVyA-INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina

⁴ Residente em medicina veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

⁵ Embrapa Gado de Corte, Brasil

*Autor para correspondência: danicazola@gmail.com

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecto contagiosa, causada por *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). O diagnóstico presuntivo é realizado por meio de testes intradérmicos e inspeção de abate (Acha & Szyfres 2001, Brasil 2006, OIE 2009). A combinação do isolamento micobacteriano em meio de cultura a partir de tecidos bovinos com a identificação e genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle da doença. Para este propósito, é necessário ter uma correlação entre genotipagem e dados epidemiológicos (Haddad et al. 2004).

Os dados de genotipagem molecular permitem distinguir os genótipos de *M. bovis* que são predominantes em uma área específica e como os focos múltiplos ocorrem. A técnica de spoligotyping baseia-se na amplificação por PCR do DNA no *locus* denominado de região de repetição direta (direct repeat - DR), exclusivo do genoma de micobactérias do CMT, para detectar a presença ou ausência de espaçadores nesse *locus*. A detecção é feita pela hibridação dos espaçadores a uma membrana, usando um minibloter (Kamerbeek et al. 1997).

No Mato Grosso do Sul o inquérito epidemiológico para determinação da prevalência de tuberculose bovina está em andamento. Nesse estado existem alguns estudos pontuais envolvendo o teste intradérmico, exame bacteriológico e molecular de lesões *post mortem* sugestivas de tuberculose que demonstram a presença da doença (Jorge 2001, Araújo et al. 2005, Azambuja 2010).

Diante do impacto negativo da infecção por *M. bovis* à saúde humana e animal é necessária a comprovação da infecção por meio do isolamento do agente e sua caracterização molecular. Este estudo propôs isolar, identificar e genotipar micobactérias a partir de tecidos provenientes de bovinos positivos no teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Material biológico

Foram objetos deste estudo bovinos reagentes positivos ao teste cervical comparativo (TCC) durante inquérito epidemiológico parcial da tuberculose bovina nas regiões do Planalto Sul e Norte do estado de Mato Grosso do Sul. De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) animal vigente no Brasil, todos os bovinos positivos no TCC devem ser preferencialmente encaminhados ao abate sanitário em estabelecimento com serviço de inspeção de carcaças ou destruídos na própria unidade de criação sob supervisão do serviço de defesa sanitária animal. Em caso de necropsia é necessário o uso de equipamento de proteção individual e descontaminação de todos os materiais utilizados. Desse modo, durante o abate sanitário ou necropsia, foram coletadas amostras teciduais de pulmão e linfonodos, com ou sem lesões sugestivas de tuberculose, de 13 bovinos adultos positivos no TCC.

Os bovinos pertenciam a 10 rebanhos de exploração leiteira e um rebanho de corte, todos sem histórico de tuberculose. Tratavam-se de pequenas propriedades, a maioria assentamentos rurais, que trabalhavam em regime de economia familiar, localizadas nos municípios de Anaurilândia, Bandeirantes, Iguatemi Itaquiraí, Tacuru, Terenos, e Ponta Porã.

Cultivo

Em no máximo dois dias após a coleta, as amostras teciduais foram homogeneizadas e descontaminadas pelo método de Petroff (Petroff 1915). A mistura do homogeneizado com o descontaminante NaOH 4% foi incubada e, em seguida, neutralizada. A suspensão foi centrifugada e o sedimento inoculado em meio de cultura de Stonebrink (Corner 1994). As culturas foram incubadas a 37°C e o crescimento bacteriano foi verificado semanalmente por um período de, pelo menos, 90 dias. As amostras bacterianas obtidas foram coradas em lâminas histológicas pela coloração de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Identificação molecular

A extração de DNA dos isolados de BAAR foi realizada por meio de termólise (Mazars et al. 2001). Os DNA obtidos foram submetidos a duas PCR multiplex (mPCR) de acordo com Figueiredo et al. (2009). Em ambas foram empregados os oligonucleotídeos JB21 (5' TCGTCCGCTGATGCAAGTGC 3') e JB22 (5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3'), que amplificam um produto de 500 pares de base (pb) da sequência alvo RvD1Rv2031c, para identificação de *M. bovis* (Rodríguez et al. 1995). Na primeira m-PCR foram incluídos os oligonucleotídeos TB11 (5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3') e TB12 (5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'), que amplificam um produto de 439 pb do gene hsp65, presente no gênero *Mycobacterium* spp. (Telenti et al. 1993). Na segunda mPCR, foram incluídos oligonucleotídeos INS-1 (5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3') e INS-2 (5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3') que amplificam um fragmento de 245 pb da sequência de inserção IS6110, presente nas micobactérias do CMT (Hermans et al. 1990). A análise dos produtos foi realizada 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 mA durante 180 minutos, em migração paralela ao padrão de 100 pb (PCR Low Ladder Marker Set - Sigma®). O gel foi corado com Sybr Gold (Invitrogen®) e fotodocumentado em sistema Gel Doc XR (Bio-Rad®). Os produtos de amplificação foram visualizados por meio do Software Quantity One (Bio-Rad®).

Genotipagem de micobactérias

As micobactérias foram genotipadas por spoligotyping, independente do resultado da identificação por mPCR. Esse método foi realizado em colaboração com o Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), em Buenos Aires – Argentina, de acordo com o descrito por Kamerbeek et al. (1997). A amplificação da região DR foi realizada em volume final de 50 µL, com 0,2 mM de cada dNTP (10 mM tris- HCl, pH 8,0; 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo (DRa e DRb), 1 U de *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA. A PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, 20 ciclos a 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, seguido por extensão final a 72°C por 5 minutos.

DNA de *M. bovis* BCG e de *M. tuberculosis* H37Rv foram usados como controles positivos do experimento e água ultra-pura como controle negativo.

Os produtos da PCR foram transferidos para uma membrana de nylon (Ocimum Biosolutions, INDIA) contendo 43 oligonucleotídeos, correspondentes às sequências espaçadoras conhecidas na região DR, com os quais foram hibridados. Após a incubação com o conjugado streptavidina-peroxidase, os espaçadores foram detectados por quimioluminescência. A identificação oficial dos padrões de spoligotyping encontrados foi obtida no website mbovis.org (Smith & Upton 2011).

RESULTADOS

Dos 13 bovinos positivos no TCC, sete (53,8%) tinham pelo menos uma lesão sugestiva de tuberculose em linfonodos retrofaríngeos, parotídeos e pulmonares ou no pulmão, e em 6 (46,2%) não foram encontradas lesões sugestivas da doença. Todas as amostras teciduais coletadas dos bovinos positivos no TCC foram cultivadas e apresentaram isolamento bacteriano. Os isolados provenientes de tecidos com lesões sugestivas de tuberculose apresentaram colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular, típicas de micobactérias. Em relação aos isolados provenientes dos fragmentos de tecidos sem lesão, quatro apresentaram colônias atípicas, de coloração amarelo ouro, e duas com crescimento escasso, mas morfologia típica de *M. bovis*. Submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen, todos os isolados apresentaram características tintoriais de BAAR.

Na PCR com os oligonucleotídeos TB11/TB12, identificou-se o gênero *Mycobacterium* spp. em 11/13 isolados (84,6%). Na PCR com os oligonucleotídeos INS1/INS2 e JB21/JB22, identificou-se CMT e espécie *M. bovis* em 8/13 (61,5%) e 7/13 (53,8%) isolados, respectivamente.

Quatro spoligotipos previamente identificados na base de dados foram observados em 9/13 (69,2%) isolados de BAAR. Três deles formaram agrupamentos de genótipos e um apresentou perfil único. Quatro isolados de BAAR apresentaram perfil de spoligotipo SB0121, dois SB1145, dois SB0881 e o perfil único SB0140.

O perfil de spoligotipo mais frequente (SB0121) foi também o que apresentou menor concordância com os demais resultados, ou seja, duas amostras bacterianas que apresentaram esse perfil eram formadas por colônias atípicas, foram identificadas por PCR como gênero *Mycobacterium* spp., mas não como micobactérias do CMT e da espécie *M. bovis*. Outra amostra com esse perfil de spoligotipo apresentou colônias típicas de *M. bovis* e foi identificada por PCR como do gênero *Mycobacterium* spp., CMT, mas não foi amplificada pelos oligonucleotídeos JB21/JB22. Finalmente, uma amostra SB0121 apresentou positividade em todos os testes realizados.

Os demais perfis de espoligotipos identificados, SB1145, SB0881 e SB0140, concordaram completamente com os outros resultados: colônias típicas de *M. bovis* e identificação por PCR como do gênero *Mycobacterium* spp., CMT e espécie *M. bovis*. Em relação aos quatro perfis de espoligotipos não identificados (PNI), apenas um apresentou positividade em todos os demais testes de identificação molecular realizados.

Os resultados de lesões, isolamento de BAAR, mPCR e spoligotyping estão sumarizados no quadro 1. Os perfis dos espoligotipos e o fenograma deduzido estão na figura 1 e a geolocalização na figura 2.

Quadro 1. Lesões, isolamento de BAAR, PCR para detecção do gênero *Mycobacterium* spp., complexo *M. tuberculosis* e espécie *M. bovis* e perfis de espoligotipos de isolados de BAAR obtidos de tecidos de bovinos positivos no teste cervical comparativo no estado de Mato Grosso do Sul

Bovino	Procedência	Lesão	Culturas BAAR	TB11/12	INS	JB21/22	Perfil de espoligotipo
1	Mundo Novo	-	atípica	-	-	-	PNI
2	Terenos	-	atípica	+	-	-	SB0121
3	Tacuru	-	atípica	+	-	-	SB0121
4	Anaurilândia	-	atípica	+	-	-	PNI
5	Anaurilândia a	+	típica	+	+	+	SB1145
6	Anaurilândia b	+	típica	+	+	+	SB1145
7	Iguatemi a	+	típica	+	+	+	SB0140
8	Iguatemi b	+	típica	+	+	+	PNI
9	Bandeirantes	+	típica	+	+	+	SB0121
10	Ponta Porã a	+	típica	+	+	+	SB0881
11	Itaquiraí	-	típica	+	+	-	SB0121
12	Paranhos	+	típica	-	-	-	PNI
13	Ponta Porã b	-	típica	+	+	+	SB0881

- = negativo, + = positivo, a/b = animais da mesma propriedade, PNI= perfil não identificado.

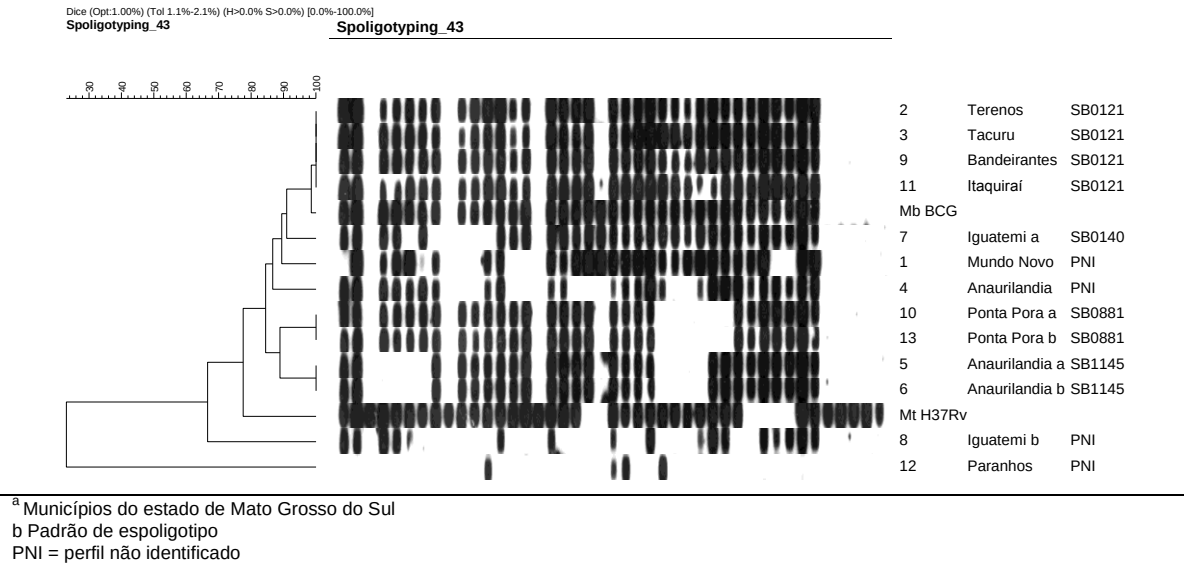


Fig. 1. Perfis genotípicos dos spoligotipos obtidos de isolados de BAAR de tecido de bovinos positivos no teste intradérmico, procedentes do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, e das amostras padrão BCG de *M. bovis* e H37Rv de *M. tuberculosis*, segundo anotação internacional (www.mbovis.org). O fenograma deduzido está no lado esquerdo.

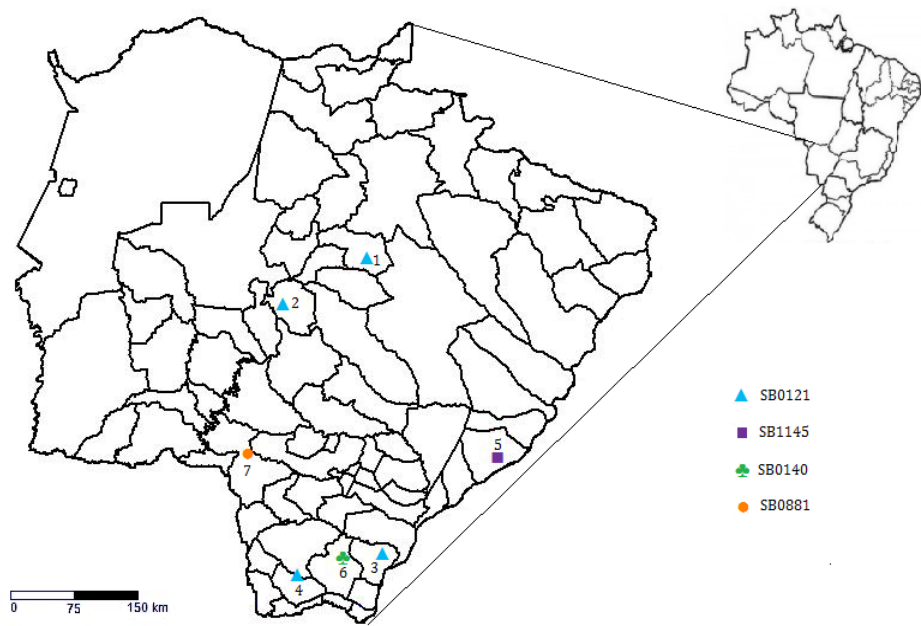


Fig. 2. Localização geográfica dos isolados de BAAR genotipados por meio da técnica de spoligotyping encontrados no estado de Mato Grosso do Sul (1: Bandeirantes; 2: Terenos; 3: Itaquiraí; 4: Tacuru; 5: Anaurilândia; 6: Iguatemi; 7: Ponta Porã).

DISCUSSÃO

Dos 13 bovinos submetidos à necropsia ou abate sanitário, em apenas sete foi possível encontrar lesões visíveis sugestivas de tuberculose, embora se tratasse de animais positivos no TCC. As lesões foram visualizadas com maior frequência em linfonodos retrofaríngeos, parotídeos, pulmonares e no pulmão. No entanto, com a

generalização da infecção em alguns animais, essas também foram encontradas em outros tecidos. Os bovinos cujos órgãos não apresentaram lesões macroscópicas detectáveis (6/13) poderiam estar recentemente infectados (Brasil 2006), pois o quadro lesional da tuberculose é complexo e varia consoante com o tempo e o tipo de evolução da doença. O reconhecimento das lesões macroscópicas associadas a esta doença, principalmente durante a inspeção sanitária de rotina nos matadouros, é muito importante no diagnóstico da infecção, sendo responsável pela identificação de focos nos rebanhos. No entanto, o encontro de lesões é dificultado pelo fato da inspeção de rotina não ser tão pormenorizada como nos casos de abates sanitários de animais positivos aos testes intradérmicos (Shitaye et al. 2006, Wilsmore & Taylor, 2008).

Amostras teciduais dos 13 bovinos positivos no TCC, com ou sem lesão macroscópica sugestiva de tuberculose, foram cultivadas e resultaram em isolamentos de BAAR. Possivelmente, o sucesso da recuperação de micobactérias em cultura deveu-se às condições favoráveis de coleta e de conservação das amostras, que devem ser feitas de maneira asséptica, dando preferência para tecidos intactos, acondicionadas em recipiente estéril e mantidas sob-refrigeração de +2°C a +8°C para o transporte (CPZ 1988, OIE 2009). De acordo com Corner (2012), apesar da positividade no TCC, o diagnóstico da tuberculose bovina somente é confirmado após o isolamento e identificação de colônias de BAAR a partir dos tecidos.

As mPCR utilizadas nesse estudo identificaram 7/13 isolados de BAAR como gênero *Mycobacterium* spp., CMT e espécie *M. bovis*. Esses isolados eram colônias típicas de *M. bovis*. Nos demais isolados que também apresentaram colônias típicas, um foi identificado por mPCR como gênero *Mycobacterium* spp. e CMT (bovino 11), e em outro (bovino 12) não houve amplificação. Fatores como concentração de DNA na reação, variabilidade genética, além de possíveis inibidores da PCR presentes na reação poderiam justificar esses resultados (Michel et al. 2010). Além disso, um estudo realizado por Sechi e colaboradores (2000) concluiu que nem todas as cepas de *M. bovis* podem ser identificadas com oligonucleotídeos direcionados para o fragmento de 500 pb, como é o caso de JB21/JB22, uma vez que esse fragmento pode estar ausente. Como esta característica genotípica pode não ser tão infrequente, o uso de um único par de oligonucleotídeos pode produzir resultados falso negativos. Portanto, a adição de mais um par de oligonucleotídeos com alvo para uma sequência diferente, como em uma mPCR, diminui a ocorrência destes resultados (Figueiredo et al. 2010, Sales et al. 2014).

Cabe destacar que os oligonucleotídeos JB21/JB22 embora tenham sido propostos como espécie-específico (Rodríguez et al. 1995), em estudo posterior Rodríguez et al. (1999) verificaram que algumas cepas de *M. tuberculosis* também podiam ser amplificadas por eles. Embora haja relatos de *M. tuberculosis* infectando bovinos (Ameni et al. 2011, Mbugi et al. 2012, Romero et al. 2011, Thakur et al. 2012), no Brasil mais de 2000 culturas de lesões presuntivas de tuberculose bovina foram testadas para essa espécie em laboratório de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e não houve resultados positivos (Araújo et al. 2014). De qualquer modo, os benefícios da PCR baseada nessa sequência de 500 pb não podem ser menosprezados, uma vez que a amplificação é indicativa da presença do agente infeccioso causador da tuberculose bovina (Rodríguez et al. 1999).

Entre os quatro isolados de BAAR que apresentaram colônias atípicas, três (75%) foram identificados apenas como gênero *Mycobacterium* spp. (Quadro 1). Essa identificação pode referir-se a contaminação por micobactérias atípicas, de crescimento rápido, que muitas vezes inibem o crescimento do patógeno presente na forma paucibacilar da tuberculose bovina (OIE 2009), característica que dificulta o diagnóstico. Essa situação foi verificada por meio da técnica PRA-hsp65 que resultou em padrão compatível com *M. avium* subsp. *avium* tipo 5 ou *M. colombiense* tipo 1 (dados não mostrados).

A pesquisa dos espilogotipos foi uma importante ferramenta para discriminar os genótipos de *M. bovis* presentes nos rebanhos bovinos de Mato Grosso do Sul. No presente estudo, foram identificados quatro espilogotipos — SB0121, SB1145, SB0140 e SB0881 — com deleções nos espaçadores de 3, 9, 16 e 39-43, o que é característico de cepas de *M. bovis* (Kamerbeek et al. 1997, Haddad et al. 2004).

Em nove isolados de BAAR foram encontrados espilogotipos da espécie *M. bovis* mesmo que desses, dois eram provenientes de animais sem lesões visíveis ao abate, mas com colônias típicas (bovinos 11 e 13). A PCR identificou o DNA isolado do bovino 11 como *Mycobacterium* spp. e CMT; do bovino 13 como *Mycobacterium* spp., CMT e da espécie *M. bovis*. Nesse caso, a técnica de spoligotyping foi importante também para identificar a espécie *M. bovis*. Outros dois isolados de BAAR (bovinos 2 e 3) eram colônias atípicas identificadas por PCR apenas como *Mycobacterium* spp.. O isolamento concomitante de micobactérias atípicas, cujo crescimento costuma ser rápido e abundante, pode ter inibido o crescimento de colônias de *M. bovis*, que é lento e escasso (Corner 1994). Ainda assim, por se tratar de uma técnica que requer menor concentração de DNA o spoligotyping foi capaz de indentificar *M. bovis* e discriminar o perfil de espilogotipo (Kamerbeek et al. 1997, Sola et al., 1999).

A técnica de spoligotyping não identificou perfis de espilogotipos em 4/13 isolados de BAAR. Dois isolados (bovino 1 e 4) eram colônias atípicas provenientes de bovinos sem lesões visíveis ao abate, e a PCR identificou como *Mycobacterium* spp. apenas o DNA do isolado do bovino 4. Por outro lado, em um isolado (bovino 12) proveniente de bovino com lesão tecidual não houve amplificação de DNA com os oligonucleotídeos TB11/12, INS1/2 e JB21/22. Já no spoligotyping o padrão de espilogotipo encontrado foi incompleto (Figura 1), possivelmente por não haver DNA suficiente para amplificação da região alvo.

No isolado proveniente do bovino 8, seu perfil de espoligotipo não foi identificado, mesmo com a presença de lesão tecidual e a amplificação do DNA com os três pares de oligonucleotídeos utilizados. Esse resultado pode significar a descoberta de um novo perfil de espoligotipo ainda não anotado no banco de dados (www.mbovis.org), possivelmente porque essa cepa se encontra em baixa proporção na população de *M. bovis* da região estudada.

Haddad et al. (2004) sugeriram a existência de dois grupos de espoligotipos dominantes, o primeiro representado pela estirpe BCG ancestral (SB0120) e SB0121 que se difere da estirpe original apenas pela perda do espaçador 21, frequente em países como Itália, França, Bélgica, Espanha e Portugal, e o segundo grupo representado por SB0140, presente na Inglaterra. De acordo com essa teoria, os tipos de ancestrais tornaram-se o padrão dominante nos países onde foram introduzidos ou evoluíram para espoligotipos semelhantes. O resultado deste trabalho mostrou que o perfil de espoligotipo predominante em Mato Grosso do Sul foi o SB0121, também identificado no estado de São Paulo (Rodríguez et al. 2004, Rocha et al. 2013). Nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraíba sua presença também já foi relatada (Parreiras et al. 2012). Segundo Zumárraga et al. (2013), esse espoligotipo é o mais prevalente no Brasil, presente também no México e na Venezuela, mas não detectado na Argentina. Na Europa, esse espoligotipo é frequentemente relatado na França (Haddad et al. 2001), Espanha (Rodríguez et al. 2010) e Portugal (Duarte et al. 2008). Curiosamente, nesse estudo, observou-se que a maior parte dos isolados com esse espoligotipo (3/4) era proveniente de bovinos sem lesões visíveis, o que pode sugerir baixa virulência (Garbaccio et al. 2014), embora não se conhecesse o estágio de evolução da doença.

O espoligotipo SB0140 também já foi detectado no estado de São Paulo (Rocha et al. 2013), porém Zumárraga et al. (2013) consideram sua frequência baixa no Brasil. É predominante nos países vizinhos, Argentina e Chile e já foi relatado no Reino Unido, Nova Zelândia, Austrália e Irlanda (Cousins et al. 1998, Costelo et al. 1999, Zumárraga et al. 1999, Haddad et al. 2001, Smith et al. 2011).

O espoligotipo SB0881, caracterizado pela ausência dos espaçadores 21 e 26-30 (Zumárraga et al. 2013), foi relatado anteriormente em São Paulo (Rocha et al. 2013) e é o terceiro mais encontrado no Brasil (Zumárraga et al. 2013). Também já foi relatado na França e na Espanha (Haddad et al. 2001, Rodríguez et al. 2010).

O espoligotipo SB1145 foi previamente referido apenas no Brasil (www.mbovis.org) em isolados de Minas Gerais (Parreiras et al. 2012).

Os quatro espoligotipos identificados nesse estudo, os predominantes na América Latina e aqueles presentes em países europeus, possuem similaridade. Essa, possivelmente é consequência das relações econômicas entre esses países ocorridas a partir da metade do século XIX, quando a importação de bovinos era principalmente de origem europeia (Zumárraga et al. 2013).

Cepas presentes em diferentes estados com o mesmo padrão de espoligotipo podem ser resultantes da movimentação de animais contaminados entre diferentes regiões (Zumárraga et al. 2013) ou de homoplasia (Comas & Gagneux 2009). A movimentação de animais doentes acontece pela dificuldade em distinguir animais anérgicos na tuberculinização e por falhas de saneamento dos focos ou no controle de trânsito animal (Lepper et al. 1977). O perfil SB0121 foi encontrado em diferentes municípios de Mato Grosso do Sul, o que também pode ser justificado pela movimentação de animais. Não foi identificada a presença de diferentes perfis genotípicos de *M. bovis* em propriedades que apresentaram dois animais positivos.

A aplicação da técnica de epidemiologia molecular por spoliotyping, em isolados de BAAR obtidos a partir de amostras teciduais de bovinos positivos no TCC em diferentes municípios de Mato Grosso do Sul, demonstra que há diversidade genética entre os espoligotipos presentes no estado, embora predomine o perfil SB0121.

A associação das técnicas de diagnóstico *ante-mortem* da tuberculose, preconizadas pelo PNCEBT, com técnicas de identificação e genotipagem molecular, facilitam as atividades de saneamento, incluindo a vigilância de doenças e a investigação de surtos, identificando padrões de transmissão e fatores de risco. Além disso, em combinação com dados espaciais, destaca a distribuição geográfica de cepas de *M. bovis*. Dessa forma contribui para eficiência dos programas de controle e erradicação da tuberculose.

Agradecimentos.- A equipe do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, da Universidade de São Paulo - USP e da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul - IAGRO, responsável pelo planejamento do inquérito epidemiológico da tuberculose bovina.

REFERÊNCIAS

Acha P.N., Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, 3 ed, Washington, D.C., 3:271.

- Ameni G., Vordermeier M., Firdessa R., Aseffa A., Hewinson G. et al. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. Vet. J. 188: 359-361.
- Araújo C.P., Osório A.L.A.R., Jorge K.S.G., Ramos C.A.N., Filho A.F.S. et al. 2014. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Bubaline Tissues Using Nested-PCR for TbD1. Plos one 9 (3): e91023.
- Azambuja A.D. Estratégias de diagnóstico da tuberculose bovina. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- Brasil. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília.
- Centro Panamericano de Zoonosis (CPZ). 1988. Bacteriologia de la tuberculosis. Buenos Aires.
- Comas I., Gagneux S. 2009. The Past and Future of Tuberculosis Research. PLoS. Pathog. 5 (10): e1000600.
- Corner L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40(1-2): 53-63.
- Costello E., O'Grady D., Flynn O., O'Brien R., Rogers M., Quigley F., Egan J., Griffin J. 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. J. Clin. Microbiol. 37: 3217-3222.
- Corner L.A.L., Gormley E., Pfeiffer D.U. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximizing the number of positive cultures. Vet. Microbiol. 156: 162-171.
- Cousins D., Williams S., Liébana E., Aranaz A., Bunschoten A., van Embden J.D.A., Ellis T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 36: 168-178.
- Duarte E.L., Domingos M., Amado A., Botelho A. 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. Vet. Microbiol. 130: 415-421.
- Figueiredo E.E.S., Silvestre F.G., Campos W.N., Furlanetto L., Medeiros L., Lilenbaum W., Fonseca L. S., Silva J.T., Paschoalin V. 2009. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates by a multiplex PCR. Braz. J. Microbiol. 40:231-233.
- Figueiredo, S. M.; Rocha, V. C. M.; Higino, S. S. S.; Batista, C. S. A.; AlveS, C.J.; Clementino, I. J.; Azevedo, S. S. 2010. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. Pesq. Vet. Bras. 30(9): 712-716.
- Garbaccio S., Macias A., Shimizu E., Paolicchi F., Pezzone N., Magnano G., Zapata L., Abdala A., Tarabla H., Peyru M., Caimi K., Zumárraga M., Canal A., Cataldi A. 2014. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. Virulence. 5(2):297-302.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hughes S.L., Inwald J., Hewinson R.G., Durand B. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. J. Clin. Microbiol. 39: 3623- 3632.
- Haddad N., Masselot M., Durand B. 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res. Vet. Sci. 76:1-18.
- Hermans P.W., Van Soolingen D., Dale J.W., Schuitema A.R., Mcadam R.A., Catty D., Van Embden J.D. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28:2051-2058.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., Van Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35:907-914.
- Lepper A.W.D., Pearson C.W., Corner, L.A. 1977. Anergy to tuberculin in beef-cattle. Australian Veterinary Journal 53: 214-216.

- Mazars E., Lesjean S., Banuls A., Gilbert M., Vicent V., Gicquel B., Tibayebnc M., Loch C., Supply P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(04): 1901-1906.
- Mbugi E.V., Katala B.Z., Kendall S., Good L., Kibiki G.S. et al. 2012. Tuberculosis 461 cross-species transmission in Tanzania: Towards a One-Health concept, Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 79:1-6.
- Michel A.L., Muller B., Van Helden P.D. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140: 371-378.
- OIE 2009. World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5 ed. Paris: OIE.
- Petroff S.A. 1915. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J. Exp. Med.* 21: 38-42.
- Parreiras P. M., Andrade G. I., Nascimento T.F., Oelemann M.C., Gomes H.M., Alencar A.P., Assis R.A., Mota P.M.P.C., Pereira M.A.S., Lobato F.C.F., Lage A.P., Suffys P.N. 2012. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107(1): 64-73.
- Rocha V. C.F., Figueiredo S.C., Rosales C. A.R., Hildebrand J.H.F.G., Keid L.B., Soares R. M., Ferreira Neto J.S. 2013. Molecular discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13(1):17-21.
- Rodríguez J.G., Mejia G.A., Del Portillo P., Patarroyo M.E., Murilo L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiol.* 141:2131-2138.
- Rodríguez J.G., Fissanoti J.C., Del Portillo P., Patarroyo M.E., Romano M.I., Cataldi A. 1999. Amplification of 500-basepair fragment from isolates of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 37(7): 2330-2332.
- Rodriguez C.A.R., Zumárraga M.J., Oliveira E.M., Cataldi A.A., Romano M.I., Otto H.H., Bonafé V.L., Ferreira Neto J.S. 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. *Arq. Insti. Biol.* 71(1): 277-282.
- Rodríguez S., Romero B., Bezos J., de Juan L., Alvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., González S., Sáez-Llorente J.L., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet. Microbiol.* 141: 89-95.
- Romero B., Rodríguez S., Bezos J., Díaz R., Copano M.F. et al. 2011. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 2393-2395.
- Sechi L.A., Duprè, Leori G., Fadda G., Zanetti S. 2000. Distribution of a Specific 500-Base-Pair Fragment in *Mycobacterium bovis* Isolates from Sardinian Cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38(10):3837-3839.
- Sales M.L, Fonseca Jr., Sales E.B., Cottorello A.C.P., Issa M., Mikael, Hodon M.A., Paulo Martins Soares-Filho P.M., Ramalho A.R., Silva M. R., Lage A. P., Heinemann M.B. 2014. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. *Folia Microbiol.*
- Shitaye, J. E., Getahun, B., Alemayehu, T., Skoric, M., Treml, F., Fictum, P., Vrbas, V. and Pavlik, I. 2006. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. *Vet Med-Czech*, 51(11): 512-522.
- Smith N.H., Upton P. 2011. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infect. Genet. Evol.* 12(4): 873-6.
- Sola C., Devallois A., Horgen L., Maisetti J., Filliol I., Legrand E., Rastogi N. 1999. Tuberculosis in Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 5(3): 404-414.
- Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E.C., Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.

Thakur A., Sharma M., Katoch V.C., Dhar P., Katoch R.C. 2012. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. Indian J. Microbiol. 52: 289-291.

Website hosts the *Mycobacterim bovis* Spoligotyping Database 2013. Disponível em <<http://www.mbovis.org/>> Acesso em 1 dez. 2013.

Wilsmore T. & Taylor N. 2008. Bovine Tuberculosis: an update. The University of Reading, Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit. 132p

Zumárraga M.J., Martin C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Ramos M.C., Cataldi A., van Soolingen D., Romano M.I. 1999. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* - related infections in South America. J. Clin. Microbiol. 37: 296-303.

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.R., Santillán M.A., Suffys P.N., Trangoni M.D., Zárraga A.M., Cataldi A. 2013. Understanding the relationship between *ycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. Res. Vet. Sci. 94: 9-21.