

ELIZABETH HORTÊNCIO DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Mycobacterium bovis PROVENIENTES DE BOVÍDEOS LEITEIROS
DIAGNOSTICADOS COM TUBERCULOSE CLÍNICA**

RECIFE

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

ELIZABETH HORTÊNCIO DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Mycobacterium bovis PROVENIENTES DE BOVÍDEOS LEITEIROS
DIAGNOSTICADOS COM TUBERCULOSE CLÍNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária

Orientadora: Dra. Carla Lopes de Mendonça

Co-orientador: Dr. Harrison Magdinier Gomes

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M528c Melo, Elizabeth Hortêncio de
Caracterização genotípica de isolados de *Mycobacterium bovis*
provenientes de bovídeos leiteiros diagnosticados com tuberculose
clínica / Elizabeth Hortêncio de Melo. – 2019.
80 f. : il.

Orientadora: Carla Lopes de Mendonça.
Coorientador: Harrison Magdinier Gomes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife,
BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Bovino de leite - Doenças 2. Tuberculose em animais
3. Micobactérias 4. *Mycobacterium bovis* 5. Bovino de leite - Genética
molecular I. Mendonça, Carla Lopes de, orient. II. Gomes, Harrison
Magdinier, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Caracterização genotípica de isolados de *Mycobacterium bovis*
provenientes de bovídeos leiteiros diagnosticados com tuberculose clínica**

Tese de doutorado elaborada por

ELIZABETH HORTÊNCIO DE MELO

Aprovada em 20/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Orientadora - Dr^a Carla Lopes de Mendonça
Clínica de Bovinos de Garanhuns - UFRPE

Dr. Harrison Magdinier Gomes
Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias - Fiocruz, RJ

Dr. José Augusto Bastos Afonso
Clínica de Bovinos de Garanhuns - UFRPE

Dr. Rodolfo José Cavalcanti Souto
Clínica de Bovinos de Garanhuns - UFRPE

Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

*Dedico ao meu filho amado Pedro
Henrique Ferreira Lima fonte de amor e
carinho*

*A fé é a garantia do que se espera e a
prova do que não se vê. Hebreus 11:1*

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me mostrar todos os dias que a minha dependência vem inteiramente D'ele. Obrigada por seu imenso amor, graça e bondade e por sua presença constante em minha vida, guiando todos os meus passos e fortalecendo-me.

Ao meu filho Pedro Henrique Ferreira Lima, o melhor presente que já recebi! Amor da minha vida! Obrigada pelo seu amor, carinho, amizade e respeito. Você é um filho que enche o coração da sua mãe de alegria e orgulho.

Aos meus pais Antônio Hortêncio e Marluce Matias e aos meus irmãos Emanuel e Edilson, pelo imenso carinho, amor, cuidado, incentivo e por sempre estarem ao meu lado em todo tempo.

A Dr^a Carla Lopes de Mendonça, pela oportunidade gerada quando da decisão em fazer o doutorado, por todo esse tempo de ensinamentos, de construção profissional e confiança depositadas. Por não ter medido esforços para o cumprimento de todo o processamento laboratorial dessa pesquisa. Por toda a disponibilidade, dedicação, compreensão e principalmente por ter perseverado no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. José Augusto Bastos Afonso pelos ensinamentos e orientações contribuindo de forma significativa para minha formação profissional. Obrigada por sonhar há muito tempo atrás (desde quando começou a guardar as primeiras amostras) que um dia esse trabalho pudesse ser realizado e por me ajudar nos momentos em que eu não conseguia enxergar o que estava a minha frente.

Ao Dr. Harrison Magdinier Gomes, por ter me acompanhado na Fiocruz, me orientando, ensinando-me com tanta dedicação, me explicando o vasto mundo da genotipagem molecular. Sou imensamente grata a Deus, porque em meio a tudo isso, ainda recebi o privilégio de tê-lo como meu co-orientador, o que para mim, é motivo de grande honra. Obrigada por toda ajuda quando tudo o que eu pensava era Spoligotyping e MIRUs.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos (Processo IBPG 1461-5.05/15).

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade e atenção.

A Professora Marília Masello Junqueira Franco (UNESP/Botucatu) que contribuiu de forma significativa, sendo fundamental no desenvolvimento desta pesquisa, pela atenção, acolhimento e ensinamentos estando sempre à disposição no decorrer de toda essa caminhada.

Aos Professores Hélio Langoni e Antonio Carlos Paes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Unesp Botucatu por toda a atenção e colaboração neste projeto.

Ao Fernando José Listoni, do Laboratório de Microbiologia, departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Unesp Botucatu que foi o responsável direto pelo cultivo microbiológico das amostras enviadas e que tanto me ensinou durante o tempo em que estive no laboratório.

Aos Pós Graduandos/ UNESP Botucatu especialmente Samea Fernandes que me ajudou com o processamento molecular da PCR, ao André Mota e Carolina Lechinsky pela atenção.

Ao Dr Philip Suffys do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz por toda atenção, participação e colaboração nesta pesquisa.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular aplicada à micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, pelo acolhimento e carinho durante o período de realização das análises laboratoriais, especialmente ao Pós-graduando, Ícaro Rodrigues pela atenção e disposição para me ensinar o processamento das análises moleculares.

A todos médicos veterinários, Nivaldo Azevedo Costa, Maria Isabel de Souza, Luís Teles Coutinho, Nivan Antônio, Rodolfo José Cavalcanti Souto e Jobson Filipe Cajueiro, que fazem a Clínica de Bovinos de Garanhuns, ser um exemplo de ensino, pesquisa e extensão, e terem contribuído de forma intensiva a minha formação.

A minha amiga Uila Alcântara, pela amizade construída desde o período da residência, por estar sempre ao meu lado nos momentos felizes como em alguns mais difíceis. Eu acredito que Deus coloca pessoas na nossa vida com propósito, e você estará sempre presente no meu coração independente do lugar no mapa que estejamos. Eu sou eternamente grata a Deus por sua vida.

Ao amigo Rodolpho Rebouças pela construção de uma amizade regada com respeito, confiança e sinceridade. Por todos os momentos de convivência e companheirismo desde a época da residência. Nunca vou esquecer da sua ajuda e solidariedade quando eu mais precisei. Sou imensamente grata.

Aos amigos veterinários que a Clínica de Bovinos me proporcionou Adony Andrade, Gliére Soares, Ana Clara Sarzedas, Ângela Imperiano, Regina Nóbrega, Leonardo Magno, Jomel Francisco, José Ricardo, Gabriel Barbosa, Alexandre Mota, Rafael Otaviano que estiveram presentes ao longo dessa jornada. Obrigada pela amizade, apoio e aprendizado.

A todos os funcionários da Clínica de Bovinos, especialmente Selma Brito, Luciano Fernandes, Sebastião Benedito, Cícero Tavares, Emanuel Barbosa e Vanessa Botelho pelo carinho, atenção e respeito, por toda ajuda ao longo desse tempo.

Ao amigo Saulo de Tarso Gusmão, pela amizade, carinho, incentivo, orientações e por estar comigo me ajudando em muitos momentos.

A Priscila Araújo mais uma amiga que a Clínica de Bovinos me proporcionou, pelo tempo de aprendizado, por ter tido o privilégio de compartilhar tantos bons momentos e ter me ajudado em outros mais difíceis.

A todos os professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco, especialmente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária que contribuíram diretamente nessa etapa tão importante.

As minhas amigas Rosângela Ferreira e Patrícia Magalhães, pela amizade, carinho, orientações e palavras de fortalecimento, encorajamento e fé.

A todos os amigos que estiveram presentes e contribuíam de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos muito Obrigada !!!!!

RESUMO

O interesse pelos métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose bovina assume papel relevante no conhecimento epidemiológico desta enfermidade, pois permitem comparar sequências do genoma de micobactérias, identificando similaridades genéticas dentre as linhagens de *M. bovis* circulantes em um rebanho e/ou regiões geográficas. A tuberculose bovina causada pelo *Mycobacterium bovis* representa risco potencial a saúde humana devido ao caráter zoonótico relacionado ao consumo de leite cru e derivados lácteos não pasteurizados. Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização genotípica de *M. bovis* isolados de bovídeos diagnosticados clinicamente com tuberculose, os quais eram procedentes de rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. Foram encaminhados para o cultivo microbiológico material (granulomas) de 30 bovídeos. Os animais cujo *M. bovis* foi isolado apresentaram como achados clínicos apatia, inapetência, baixo escore corporal, secreção nasal seromucosa, tosse seca, dispnéia, taquipnéia, polipnéia, crepitações e áreas de silêncio nos campos pulmonares. Os achados *post-mortem* revelaram que os animais apresentavam lesões generalizadas sugestivas de tuberculose distribuídas principalmente nos pulmões, linfonodos mediastínicos e traqueobrônquicos, fígado, linfonodos mesentéricos, glândula mamária e útero. O cultivo microbiológico revelou crescimento de colônias compatíveis com *Mycobacterium* sp em 17/30 (57%) que foram confirmados pelas técnicas moleculares como *M. bovis*. A análise por *Spoligotyping* classificou os 17 isolados em cinco perfis distintos de *M. bovis* (SB0121), (SB0295), (SB0852), (SB0120) e um espoligotipo ainda não classificado no banco de dados, agrupando em 3 *clusters* e 2 perfis únicos. A análise por 24-*loci* MIRU-VNTR agrupou os mesmos isolados em dois *clusters* e 13 perfis únicos, sendo mais discriminatória comparada ao *Spoligotyping*. Um *loci* (ETR A) dentre os 24 analisados por MIRU-VNTR, apresentou maior poder discriminatório com ($h > 0.6$) e cinco *loci* (ETR B, ETR C, MIRU 16, MIRU 27 e QUB 26) apresentaram moderada diversidade alélica com ($0.3 \leq h \leq 0.6$). O poder discriminatório do 24-*loci* MIRU-VNTR foi superior ao *Spoligotyping*. A associação entre as duas técnicas ratificou a melhor estratégia para a tipagem molecular de *M. bovis*, permitindo a identificação de diferentes genótipos, revelando a diversidade genotípica de cepas de *M. bovis* circulantes no estado de Pernambuco, corroborando a importância deste microrganismo como agente da tuberculose bovina e seu potencial zoonótico, sendo esta ferramenta epidemiológica determinante no rigor das práticas sanitárias de controle da doença nos rebanhos leiteiros.

Palavras-chave: Genotipagem molecular, MIRU-VNTR, *spoligotyping*, tuberculose bovina.

ABSTRACT

Interest in molecular methods for diagnosis of bovine tuberculosis plays a relevant role in the epidemiological knowledge of this disease as they allow the comparison of mycobacterial genome sequences, identifying genetic similarities among strains of *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) circulating in a herd and/or geographic regions. Bovine tuberculosis caused by *M. bovis* represents a potential risk to human health due to the zoonotic character related to the consumption of raw milk and unpasteurized dairy products. This study aimed to carry out the genotypic characterization of *M. bovis* isolated from cattle clinically diagnosed with tuberculosis, which belonged to dairy herds in the state of Pernambuco. They were sent for material microbiological cultivation (granulomas) of 30 bovines. The animals whose *M. bovis* was isolated presented as clinical findings apathy, inappetence, low body score, seromucous nasal discharge, dry cough, dyspnea, tachypnea, polypnea, crackles and areas of silence in the lung fields. *Post mortem* findings revealed that the animals had generalized lesions suggestive of tuberculosis distributed mainly in the lungs, mediastinal and tracheobronchial lymph nodes, liver, mesenteric lymph nodes, mammary gland and uterus. *M. bovis* isolates were submitted to genotypic characterization using *Spoligotyping* and MIRU-VNTR techniques. Microbiological culture revealed the growth of colonies compatible with *Mycobacterium spp.* in 17/30 (56.66%) which were confirmed by molecular techniques as *M. bovis*. *Spoligotyping* analysis ranked the 17 isolates into five distinct profiles of *M. bovis* (SB0121), (SB0295), (SB0852), (SB0120) and a spoligotype not yet classified in the database, grouping them into 3 clusters and 2 orphan patterns. The MIRU-VNTR 24-*loci* analysis grouped the same isolates into two clusters and 13 unique profiles, being more discriminatory compared to *spoligotyping*. One *locus* (ETR-A) among the 24 analyzed by MIRU-VNTR showed higher discriminatory power with ($h > 0.6$) and five *loci* (ETR-B, ETR-C, MIRU 16, MIRU 27 and QUB 26) displayed moderate allelic diversity with ($0.3 \leq h \leq 0.6$). The discriminatory power of MIRU-VNTR *loci*-24 was higher than *spoligotyping*. The combination of the two techniques ratified the best strategy for *M. bovis* molecular typing, allowing the identification of different genotypes, revealing the high genotypic diversity of circulating *M. bovis* strains in the state of Pernambuco, corroborating the importance of this microorganism as an agent of tuberculosis and its zoonotic potential, being this epidemiological tool crucial in the rigor of health practices for controlling the disease in dairy herds.

Keywords: Bovine tuberculosis, MIRU-VNTR, molecular genotyping, *spoligotyping*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Lesões granulomatosas distribuídas em pulmão e linfonodos mediastínicos (A) 51
e linfonodos mesentéricos (B). Lesões granulomatosas distribuídas no
parênquima hepático de búfalos (C, D). Lesões nodulares granulomatosas no
parênquima mamário bovino (E). Corte histológico do parênquima mamário
bovino, revelando reação inflamatória e presença de células gigantes de
Langhans (F).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização molecular dos 17 isolados de <i>M. bovis</i> pelo método <i>Spoligotyping</i>	52
----------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Caracterização molecular dos isolados de <i>M. bovis</i> no Estado de Pernambuco pelos métodos de <i>Spoligotyping</i> e MIRU-VNTR	54
Quadro 2	Perfis genéticos obtidos a partir da análise de 24 <i>loci</i> de MIRU-VNTR de 17 isolados de <i>M. bovis</i>	55
Quadro 3	Distribuição e diversidade alélica (HGDI) dos 24 <i>loci</i> de MIRU-VNTR	57
Quadro 4	Comparação do poder discriminatório do <i>Spoligotyping</i> e MIRU-VNTR	57

LISTA DE ABREVIATURAS

bTB	Tuberculose causada por <i>Mycobacterium bovis</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
DR	Direct Repeat (Região de Repetição Direta)
EPTB	Tuberculose extrapulmonar
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IS	Sequência de Inserção
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR-TB	Tuberculose Multirresistente (<i>Multidrug Resistant Tuberculosis</i>)
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
SB	Padrão espoligotipo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIT	<i>Spoligotyping International Type</i>
SSPE	Salina Sódio Fosfato EDTA
TB	Tuberculose
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	HISTÓRICO DA TUBERCULOSE.....	19
3.2	TUBERCULOSE BOVINA.....	19
3.2.1	Agente Etiológico.....	19
3.2.2	Impacto Econômico e Social.....	21
3.2.3	Epidemiologia.....	21
3.2.4	Importância na Saúde Pública.....	24
3.2.5	Achados Clínicos – Patológicos.....	26
3.2.6	Diagnóstico.....	28
3.2.6.1	Teste Alérgico – Cutâneo.....	28
3.2.6.2	Bacteriológico.....	29
3.2.6.3	Molecular.....	30
3.2.6.3.1	<i>Genoma e evolução do Mycobacterium bovis.....</i>	<i>31</i>
3.2.6.3.2	<i>Spoligotyping.....</i>	<i>33</i>
3.2.6.3.3	<i>MIRU-VNTR.....</i>	<i>38</i>
3.2.7	Controle.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	LOCAIS DE CONDUÇÃO DO ESTUDO.....	43
4.2	ANIMAIS.....	43
4.3	CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	44
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA.....	45
4.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	45
4.5.1	Reação em cadeia da polimerase.....	45
4.5.2	Genotipagem molecular.....	46
4.5.2.1	<i>Spoligotyping.....</i>	<i>46</i>
4.5.2.2	<i>MIRU-VNTR.....</i>	<i>47</i>
5	RESULTADOS.....	49

6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma enfermidade crônica, de caráter progressivo causada por *Mycobacterium bovis*, que acomete os bovinos e bubalinos, podendo infectar diversas espécies de mamíferos, inclusive a espécie humana (BROSCH *et al.*, 2002; COUSINS *et al.*, 2003).

O potencial zoonótico desta enfermidade está relacionado ao consumo de leite cru e derivados não pasteurizados, representando a principal via de transmissão para a espécie humana, principalmente nas áreas rurais, no entanto, também pode ser transmitido diretamente através da inalação de aerossóis (THOEN; BARLETTA, 2005; SOBRAL *et al.*, 2011).

A infecção nos bovinos apresenta elevada relevância econômica para pecuária nacional. O impacto negativo está diretamente relacionado à perda da produtividade como índices de crescimento mais lentos e perda de peso em animais adultos, rejeição parcial ou total da carcaça, redução da produção de leite, assim como do tempo de vida produtiva das vacas leiteiras (BRASIL, 2006; MICHEL *et al.*, 2010).

A bovinocultura representa importante setor da economia no cenário nacional, sendo o Brasil considerado um dos grandes produtores mundiais de leite (MORAES; BENDER FILHO, 2017), contudo, existe grande heterogeneidade nos sistemas de produção, caracterizado por baixo nível tecnológico, controle sanitário deficiente dos rebanhos, falta de apoio e investimentos aos produtores rurais, o que favorece a propagação de algumas enfermidades, como a tuberculose (PEDROSO; ROCHA, 2009).

No ano de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) com o objetivo de reduzir a prevalência e incidência de novos focos nos rebanhos, bem como a certificação dos estabelecimentos de criação de bovinos e bubalinos e suas respectivas medidas sanitárias (BRASIL, 2006).

Estudos caracterizando a situação epidemiológica da tuberculose bovina em diferentes estados da federação, revelaram prevalência de rebanhos infectados variável entre 0,36% no Distrito Federal (RIBEIRO *et al.*, 2016) e 9% em São Paulo (DIAS *et al.*, 2016). O estado de Pernambuco apresentou prevalência de focos e de animais infectados de 2,87% e 0,62%, respectivamente, com tendência de concentração na região do Agreste do estado, caracterizada pelo predomínio de propriedades leiteiras (LIMA *et al.*, 2016).

O interesse pelos métodos moleculares de diagnóstico tem crescido devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da doença, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste alérgico-cutâneo e o longo período de tempo para a

confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos. O cultivo microbiológico é considerado como prova padrão ouro no diagnóstico da tuberculose (DREWE; SMITH, 2014).

O sequenciamento genômico de espécies do complexo *M. tuberculosis* trouxe novas possibilidades de pesquisa para o estudo da tuberculose. Diferentes métodos moleculares desenvolvidos para caracterizar geneticamente esses isolados contribuíram para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis* favorecendo a ação dos programas de controle (DREWE; SMITH, 2014)

Essas metodologias permitem comparar sequências do genoma de micobactérias, identificando similaridades genéticas dentre as linhagens de *M. bovis* circulantes em um rebanho e/ou regiões geográficas. A associação dos métodos de tipagem molecular tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do complexo *M. tuberculosis*, conferindo reprodutibilidade e confiabilidade (KAMERBEEK *et al.*, 1997; SUPPLY *et al.*, 2006).

Dentre as técnicas de genotipagem mais utilizadas para o estudo do complexo *M. tuberculosis* destacam-se a técnica de *Spoligotyping* e o MIRU-VNTR. O estudo do número variável de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRU-VNTR) apresenta maior poder discriminatório e tem sido atualmente o método de eleição nos estudos de genotipagem de *Mycobacterium* spp (KAMERBEEK *et al.*, 1997; SUPPLY *et al.*, 2006).

A situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado de Pernambuco com enfoque na identificação do agente, principais fatores de risco, prevalência da enfermidade determinada em estudos *in vivo* e *post-mortem* vêm sendo documentada ao longo dos anos (SOBREIRA FILHO, 2008; SILVA *et al.*, 2013; CEZAR *et al.*, 2016a,b; LIMA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018) no entanto, ressalta-se a inexistência no estado de informações relacionadas ao estudo genotípico dos isolados de *M. bovis* provenientes de casos clínicos de tuberculose em bovinos e bubalinos de aptidão leiteira.

Considerando o impacto da infecção por *M. bovis* à saúde animal e à saúde humana aliado à ausência de estudos na região sobre genotipagem molecular, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização genotípica de *M. bovis* isolados de bovídeos diagnosticados clinicamente com tuberculose, procedentes de rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genotípica de *Mycobacterium bovis* isolados de bovinos e bubalinos diagnosticados com tuberculose clínica procedentes de rebanhos leiteiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os principais achados clínico-patológicos dos bovídeos diagnosticados com tuberculose.
- Realizar diagnóstico microbiológico a partir da colheita de fragmentos de órgãos ou linfonodos.
- Realizar o diagnóstico molecular (PCR) a partir do DNA extraído dos isolados de *Mycobacterium* sp identificados no cultivo.
- Realizar a genotipagem molecular dos isolados de *Mycobacterium bovis* pelo método *Spoligotyping* e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR)*

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DA TUBERCULOSE

A tuberculose é considerada uma das doenças mais antigas do mundo. Hipócrates em 460 a. C, na Grécia, descreveu lesões em pulmões e ossos compatíveis com tuberculose, atribuindo à enfermidade o nome de tísica. Na mesma época, Aristóteles considerou a enfermidade como contagiosa. Estudos foram gerados a partir de uma linha de investigação associando a escrófula (linfadenite cervical) ao consumo de leite cru, principalmente em crianças. Em 1843, o médico Philipp Klenke, defende que a linfadenite tuberculosa está diretamente ligada ao consumo de leite, uma vez que a doença era notificada com maior frequência em crianças alimentadas com leite cru, concluindo que o leite seria a fonte da infecção (GRANGE; YATES, 1994).

O bacilo da tuberculose foi isolado e identificado por Heinrich Robert Koch em 1882. Em 1896, Lehmann e Neumann definiram o nome *Mycobacterium tuberculosis* para o bacilo isolado por Koch. Mesmo diante das evidências a respeito da tuberculose como possível zoonose, Koch acreditava que o agente da tuberculose humana apresentava pouca patogenicidade para os bovinos, assim como o bacilo da tuberculose seria patogênico para os humanos. Os médicos veterinários da época, contestaram a hipótese de Koch. O governo britânico designou então uma comissão para investigar o potencial zoonótico da doença, desenvolvendo um trabalho intenso de pesquisa entre 1901 a 1911. Os estudos comprovaram que o bacilo bovino não só infectava os humanos, como também desencadeava a doença clínica. Assim, o leite bovino foi identificado como potencial via de transmissão para os humanos (PRITCHARD, 1988).

3.2 TUBERCULOSE BOVINA

3.2.1 Agente etiológico

O agente etiológico da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis* pertence a classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* compondo o complexo *Mycobacterium tuberculosis* juntamente com as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. canetti* (BROSCH *et al.*,

2002; COUSINS *et al.*, 2003; HUARD *et al.*, 2003), *M. mungi* e *M. orygis* (ALEXANDER *et al.*, 2010; INGEN *et al.*, 2012).

Recentemente, foi relatado por RIOJAS *et al.* (2018) alterações taxonômicas e de nomenclatura do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os autores recomendam que as espécies reconhecidas do complexo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. tuberculosis*) devem ser unidas ao *M. tuberculosis*. Assim como o *M. canettii*, *M. mungi* e o *M. orygis* que ainda não tinha sido validados como membros, sejam reclassificados como pertencentes a espécie *M. tuberculosis*. Segundo os autores, os grupos filogenéticos correspondentes as espécies nomeadas, devem ser consideradas subdivisões infra específicas, ou seja, variantes. As espécies estão agora incluídas na descrição *M. tuberculosis*. A saber, *M. tuberculosis* var. *tuberculosis*, *M. tuberculosis* var. *bovis*.

As espécies do complexo *M. tuberculosis* são agrupadas por apresentarem estreita relação genética e elevado grau de conservação dos seus genomas, no entanto, as espécies demonstram importantes diferenças fenotípicas, adaptações a diferentes hospedeiros e evidenciam diferentes graus de virulência para o homem (BROSCH *et al.*, 2002; DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

As espécies do gênero *Mycobacterium* apresentam-se geralmente como bastonetes pequenos, ligeiramente encurvados ou em forma de clava. São aeróbios, não possuem motilidade e não formam esporos. Podem adaptar-se a diferentes mecanismos fisiológicos, a fim de sobreviver mesmo em condições adversas. Essa é uma estratégia não só para a patogenicidade, mas também para a persistência das espécies. Apresenta características tintoriais de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas. Essa característica é explicada pela presença de ácidos micólicos, que são lipídeos que compõe a parede celular, impedindo a remoção do corante pelo álcool-ácido que os caracteriza como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), permitindo sua identificação por microscopia direta (CORNER *et al.*, 1994).

Uma das características das micobactérias, incluindo *M. bovis* é o seu alto teor de lipídeos, particularmente na parede celular. Por meio da microscopia eletrônica, foi identificado que as micobactérias possuem parede rígida, disposta em três camadas de fora para dentro: uma parede lipoproteica, uma polissacarídica e a mais interna mucopeptídica. A parede celular é responsável pela resistência inata aos antibióticos, desempenhando importante papel para a sua virulência e viabilidade (HEINEMANN *et al.*, 2008; CAREL *et al.*, 2014).

3.2.2 Impacto econômico e social

A importância econômica atribuída à infecção nos bovinos está relacionada aos custos para a produção pecuária como consequência de índices de crescimento mais lentos e perda dos animais, rejeição parcial ou total da carcaça, redução da produção de leite, assim como do tempo de vida produtiva das vacas leiteiras. A legislação internacional que regula o comércio de animais vivos e de produtos de origem animal recomenda que esses produtos sejam originárias de países livres de infecção, de áreas, compartimentos ou propriedades livres certificadas. Assim, a tuberculose bovina ainda representa um entrave à exportação (MICHEL *et al.*, 2010).

Visando o controle e erradicação da doença, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu em 2001, o PNCEBT com o objetivo de reduzir a prevalência e incidência de novos focos nos rebanhos, bem como a certificação dos estabelecimentos de criação de bovinos e bubalinos e suas respectivas medidas sanitárias (BRASIL, 2006).

A inspeção *post mortem* dos animais destinados ao consumo nos abatedouros tem grande importância na vigilância epidemiológica da tuberculose e por meio desta medida países endêmicos, que possuem satisfatório desempenho nos serviços de inspeção, juntamente com um consolidado programa de erradicação, tem reduzido a prevalência da doença (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

3.2.3 Epidemiologia

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, persistindo em muitos países, porém concentrando-se principalmente em países em desenvolvimento (BROUGHAN *et al.*, 2016).

Estudos caracterizando a situação epidemiológica da tuberculose bovina em diferentes estados da federação, revelaram prevalência de rebanhos infectados variando entre 0,36% no Distrito Federal (RIBEIRO *et al.*, 2016) e 9% em São Paulo (DIAS *et al.*, 2016). O estado de Pernambuco apresentou prevalência de focos e de animais infectados de 2,87% e 0,62%, respectivamente, com tendência de concentração na região do Agreste do estado, caracterizada pelo predomínio de propriedades leiteiras (LIMA *et al.*, 2016).

A maior prevalência de tuberculose foi observada nas regiões de pecuária leiteira representada pelos estados do Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais e Goiás ao contrário das regiões em que predomina o rebanho para produção de carne. Os rebanhos leiteiros especialmente os mais tecnificados e de alta produção constituem fator de risco para

tuberculose, assim como a introdução de novos animais no rebanho sem realização prévia dos testes de tuberculinização têm contribuído para aumentar a prevalência da doença nos rebanhos (FERREIRA NETO *et al.*, 2016).

Alguns fatores podem favorecer a transmissão da tuberculose entre os rebanhos como o trânsito de animais em feiras, cidades e estados vizinhos, tipo de exploração, densidade do rebanho, tipo de instalação, aquisição de animais a partir de rebanhos com histórico de tuberculose e presença de animais silvestres na propriedade ou nos arredores (SKUCE *et al.*, 2012).

Estudos relacionando os principais fatores de risco apontaram que os rebanhos leiteiros mantidos em confinamento parcial ou total, densidade do rebanho, são importantes para a disseminação da tuberculose (BAHIENSE *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2016), assim como as menores taxas de prevalência são registradas nos rebanhos de corte, sugerindo associação entre a tuberculose e a atividade leiteira (NÉSPOLI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

No Brasil, *M. bovis* tem como reservatórios e fontes de infecção dentre os animais de produção os bovinos como hospedeiros primários, bubalinos e caprinos, espécies que apresentam a doença clínica. Merecendo destaque, na cadeia epidemiológica da doença, os animais infectados que ainda não manifestaram sinais clínicos, ou seja, portadores assintomáticos, que são os grandes responsáveis pela contaminação ambiental e manutenção da enfermidade na natureza (ABRAHÃO, 1998; MICHEL *et al.*, 2010).

M. bovis também pode ser o agente da tuberculose em cães e gatos, principalmente em áreas rurais, uma vez que os animais de companhia muitas vezes são alimentados com leite de vacas infectadas ou permanecem em ambientes contaminados (ABRAHÃO, 1998).

Mesmo com os programas de controle e a eliminação dos animais infectados, a tuberculose bovina continua crescente. Entre as causas desse aumento ou manutenção da infecção, é registrada a presença dos animais silvestres como reservatórios para *M. bovis*. Diversas espécies entre elas, veados (*Odocoileus virginianus*) na América do Norte, texugo (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda, javalis (*Sus scrofa*) e veados (*Cervus elaphus*) na Espanha, gambás (*Trichosurus vulpecula*), furões (*Mustela furo*) e veados (*Cervus elaphus*) na Nova Zelândia (FITZGERALD; KANEENE, 2012), rinocerontes (*Diceros bicornis*) e búfalos (*Syncerus caffer*) na África do Sul (MILLER *et al.*, 2017).

Em algumas regiões da Espanha, Portugal, Itália e na ilha mediterrânea da Córsega Francesa, observou-se o crescimento populacional de porcos selvagens e javalis, correlacionando a presença desses animais à ocorrência da tuberculose em bovinos, caprinos, suínos domésticos e cervídeos (FITZGERALD; KANEENE, 2012).

Em áreas de risco da Nova Zelândia, gambás (*Trichosurus vulpecula*) e cervos silvestres constituem reservatórios de *M. bovis*. Estratégias de controle da população de gambás resultaram em uma drástica queda na incidência da doença em rebanhos bovinos e de cervos de produção, mas os cervos silvestres são capazes de iniciar novos focos ou reiniciá-los após a remoção dos gambás. A proximidade das fazendas a parques e florestas está associada ao número de casos positivos da tuberculose (RYAN *et al* 2006; PORPHYRE *et al.*, 2008).

No Brasil, a maioria dos casos de tuberculose descritos tem sido reportado a animais mantidos em cativeiro, que podem trazer implicações significativas para a saúde pública, como resultado da possível transmissão a funcionários dos estabelecimentos e visitantes (DOMINGOS *et al.*, 2019). No país, a tuberculose causada por *M. bovis* já foi relatada em antílope (*Kobus ellipsiprymnus*) em um zoológico de São Paulo (ROCHA *et al.*, 2011), queixada (*Tayassu tajacu*) na região sul (MAYER e al., 2012), quati (*Nasua nasua*) no Paraná (MURAKAMI *et al.*, 2012) e javalis (*Sus scrofa*) de vida livre no Rio Grande do Sul (MACIEL *et al.*, 2017).

A infecção dos bovinos ocorre principalmente por via aerógena, através da inalação de gotículas de tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa. A transmissão da tuberculose bovina por via respiratória é facilitada pela convivência natural, em especial em rebanhos com alta densidade populacional assim como constante movimentação dos animais (NUGENT, 2011).

A frequência da tuberculose em bovinos com idade inferior a 12 meses está associada à infecção transplacentária ou mais comumente por meio da ingestão de colostro/leite de vacas infectadas (DEL FAVA *et al.*, 2010; KONRADT *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2018). A infecção também pode ocorrer por ingestão do agente em pastagens e uso de bebedouros e cochos coletivos contaminados por animais infectados (CASWELL; WILLIAMS, 2007).

O tempo de sobrevivência do *M. bovis* fora de seu organismo hospedeiro é fator determinante da disseminação da doença e da sua manutenção no ambiente. Havendo exposição direta à luz solar, a radiação ultravioleta destrói o patógeno em aproximadamente 12 horas. Ao abrigo da luz, o agente pode resistir e permanecer viável no ambiente por aproximadamente dois anos, ressaltando a importância para o manejo higiênico-sanitário nas instalações das propriedades, como estábulos, bezerreiros, salas de ordenha e troncos cobertos (ROXO, 1997; ABRAHÃO, 1998).

3.2.4 Importância na Saúde Pública

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, as infecções por micobactérias são os problemas mais críticos em humanos e animais. *M. bovis* é importante agente causal da tuberculose e negligenciado como zoonose, representando a segunda causa de tuberculose humana, responsável por 5 a 7.2 dos novos casos de tuberculose nos países desenvolvidos, aumentando para 10 a 15% dos casos nos países em desenvolvimento (MALAMA *et al.*, 2013; GHAVIDEL *et al.*, 2018).

Entre os 10 milhões de novos casos de tuberculose em 2017, aproximadamente 20% são de casos de tuberculose extrapulmonar (EPTB). Nas regiões com alta prevalência da tuberculose por *M. bovis*, o agente é frequentemente associado à doença extrapulmonar na população. Nos países subdesenvolvidos o percentual dos casos de TB humana associada ao *M. bovis* é geralmente subestimada, uma vez que a diferenciação das espécies dificilmente é realizada (MÜLLER *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2018).

A diferenciação dos casos de tuberculose humana causados por *M. tuberculosis* e *M. bovis* se torna essencial na compreensão da epidemiologia da tuberculose por *M. bovis*, podendo contribuir para a implementação de medidas efetivas para o controle e prevenção da tuberculose (ALLIX-BÉGUEC *et al.*, 2008).

Na região sul da Tunísia a tuberculose bovina apresenta elevada prevalência, conseqüentemente dentre os casos de EPTB diagnosticados, 77% são atribuídos a infecção por *M. bovis*. Deficiência de controle sanitário do rebanho e o consumo frequente de leite cru e derivados não pasteurizados são fatores de risco favorecendo a disseminação da tuberculose zoonótica (MÜLLER *et al.*, 2013; SIALA *et al.*, 2017).

Estudo realizado no Brasil por Silva *et al.* (2018) teve por objetivo avaliar os fatores de risco da infecção em humanos causada por *M. bovis* a partir de casos de pacientes diagnosticados com tuberculose, inclusive casos de co-infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Alguns fatores foram considerados importantes na cadeia epidemiológica e reforçam ainda mais o potencial zoonótico no *M. bovis*. Entre os fatores destacam-se o consumo de leite cru e derivados, como o queijo não pasteurizados, histórico de habitação em propriedades rurais, a constante exposição a animais (ocupacional) e a infecção pelo HIV/AIDS.

O consumo de leite cru e derivados não pasteurizados representa a principal via de transmissão da tuberculose bovina aos humanos (SOBRAL *et al.*, 2011). Ressaltando que existe consumo significativo de leite cru e derivados entre a população brasileira, particularmente na

população de áreas rurais, como também em áreas urbanas de cidades menores (PENAFORTE JÚNIOR *et al.*, 2009). A presença de *M. bovis* no leite cru e derivados foi relatada em diferentes regiões do país nos últimos anos (FRANCO *et al.*, 2013; ZARDEN *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014; BEZERRA *et al.*, 2015; CEZAR *et al.*, 2016b). Um estudo realizado na microrregião de Garanhuns, Pernambuco detectou a presença do *M. bovis* em queijos artesanais em 2,8% das amostras analisadas (CEZAR *et al.*, 2016b). Diante da realidade do risco potencial de infecção e desenvolvimento da doença, podemos afirmar que existe subnotificação da tuberculose zoonótica no país.

Franco *et al.* (2017) relataram que dentre os 67 isolados de *M. bovis* de bovinos, 21 isolados (31%) apresentaram algum padrão de resistência aos fármacos testados, destes 11 (16%) foram classificados como tuberculose multirresistente (MDR-TB). A resistência do gênero *Mycobacterium* aos antimicrobianos têm sido frequentemente associada à mutações em genes codificantes ou relacionados aos alvos celulares destes medicamentos (KOCH *et al.*, 2014). A frequência crescente de casos MDR-TB enfatizam o valor do uso dos métodos de genotipagem na compreensão das linhagens filogenéticas distintas e associadas com a multirresistência aos antimicrobianos (ALLIX-BÉGUEC *et al.*, 2008).

Embora *M. bovis* seja considerado o principal agente etiológico da tuberculose bovina, alguns estudos indicam *M. tuberculosis* como agente etiológico predominante nas áreas endêmicas da tuberculose. A possibilidade de zoonose reversa não pode ser negada, porque em regiões endêmicas, *M. tuberculosis* resistente a medicamentos em humanos pode resultar em uma potencial infecção em bovinos devido à interação homem e animal (SWEETLINE ANNE *et al.*, 2019).

Na Índia, foi realizado um estudo objetivando o diagnóstico e caracterização molecular a partir de 148 amostras de bovinos com lesões suspeitas de tuberculose, obtendo resultado de 51 isolados. No entanto, 43 (84,3%) dos isolados foram classificados como *M. tuberculosis* e 8 (15,6%) como *M. bovis*. O elevado índice de *M. tuberculosis* presente nos bovinos em contraste com outras regiões do mundo, resulta em altos níveis de tuberculose na população humana, provavelmente agregado a fatores socioeconômicos e religiosos comuns em alguns países em desenvolvimento, como na Índia, que consideram o bovino como um animal sagrado (SWEETLINE ANNE *et al.*, 2017).

Uma pesquisa desenvolvida na República dos Camarões, sobre o perfil genotípico da tuberculose, classificou 86 isolados de *M. bovis* e quatro isolados de *M. tuberculosis*. Dentre as 90 cepas identificadas, nove cepas ainda não tinham sido descritas anteriormente pelo Banco de Dados. Os autores enfatizam a transmissão contínua da tuberculose envolvendo linhagens

de cepas de *M. bovis* ainda não descritas, assim como revela uma possível transmissão reversa de humanos para animais (KORO KORO *et al.*, 2015).

Se faz extremamente necessário mais pesquisas a respeito de *M. bovis* sobre a incidência da tuberculose nos humanos, nos países em desenvolvimento e principalmente nas regiões onde a tuberculose bovina é endêmica (THOEN *et al.*, 2014). As abordagens técnicas interagindo profissionais das áreas de saúde humana e veterinária são imprescindíveis sob o ponto de vista social e econômico quando se tem como meta a Saúde Única (*One Health*) (KANEENE *et al.*, 2014; OLEA-POPELKA *et al.*, 2017).

3.2.5 Achados clínicos-patológicos

Os sinais da infecção por *M. bovis* em ruminantes são inespecíficos, a maioria dos animais infectados não demonstram manifestações clínicas, sendo potencial risco para outros animais do rebanho e para saúde pública (ROXO, 1997; IZAEL *et al.*, 2009).

Os achados clínicos surgem em estágios mais avançados da doença, podendo ser observado perda de peso progressiva, diminuição da produção leiteira, transtornos respiratórios como tosse, secreção nasal, respiração taquipneica e polipneica, dispneia e crepitações nos campos pulmonares. Na maioria dos casos, os linfonodos mediastínicos e mesentéricos apresentam-se hipertrofiados, ocasionando falhas de transporte ou obstruções e/ou timpanismo (ROXO, 1997; IZAEL *et al.*, 2009; WATERS, 2015).

A identificação de lesões patológicas durante as inspeções sanitárias de rotina nos frigoríficos é considerada ferramenta importante para o diagnóstico das infecções, que realizada em conjunto com os programas de controle e erradicação da tuberculose, tem reduzido a prevalência da doença em alguns países (DE LA RUA DOMENECH, 2006).

As lesões nodulares granulomatosas caracterizadas na tuberculose, também podem ser confundidas com outras enfermidades que provocam reações inflamatórias granulomatosas, como infecções por *Truperella pyogenes*, *Nocardia* spp, *Actinobacillus* spp, *Actinomyces* spp e alguns processos neoplásicos, por apresentarem características morfológicas semelhantes as descritas para a tuberculose (CORNER, 1994; CURCIO *et al.*, 2002; BIFFA *et al.*, 2010).

A distribuição das lesões varia de acordo com a via de infecção, podendo ser determinada pela localização do foco primário que é formado pela lesão clássica (complexo primário) no local da infecção, assim como no linfonodo regional. Em outros casos, a lesão

pode estar restrita apenas no linfonodo regional e ausente no local da infecção, caracterizando assim o complexo primário incompleto (NEILL *et al.*, 1994; DOMINGO *et al.*, 2014).

As lesões instalam-se principalmente nos pulmões, formando nódulos caseosos e de tamanhos variados, muitas vezes estão distribuídas por todo parênquima pulmonar, formando lesões cavitárias. Apesar da tuberculose bovina ser definida como doença crônica, também pode assumir caráter agudo e progressivo. A disseminação da doença (tuberculose generalizada) pode afetar qualquer tecido, sendo as lesões mais comumente observadas nos linfonodos da cabeça, pescoço, mediastínicos e mesentéricos, pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (ROXO, 1997; IZAEL *et al.*, 2009).

Os achados anatomopatológicos observados por Ramos *et al.* (2018) no exame *post-mortem* de 32 bovinos destacam as lesões granulomatosas nos linfonodos mediastínicos, traqueobrônquicos, retrofaríngeos e pulmão como predominantes, seguida dos linfonodos mesentéricos caracterizadas por necrose caseosa e focos de mineralização, rodeados por infiltrados inflamatórios com predomínio de macrófagos, células epitelióides e células multinucleadas. Em função da localização das lesões e do resultado positivo do cultivo microbiológico, o complexo primário da infecção foi estabelecido por via respiratória, como principal porta de entrada de *M. bovis*, e devido a menor ocorrência das lesões nos linfonodos mesentéricos, a via digestiva seria secundária à respiratória (TAYLOR *et al.*, 2007).

A neurotuberculose é considerada pouco frequente nos bovinos. No Brasil, existem estudos pontuais relatando a infecção afetando o sistema nervoso central, na maioria das vezes os relatos são esporádicos ou isolados (DEL FAVA *et al.*, 2010; GALIZA *et al.*, 2010; KONRADT *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2018). Essa forma da doença ocorre com mais frequência nos bovinos jovens, com manifestações de sinais neurológicos, devido à presença de lesões granulomatosas principalmente no encéfalo e medula espinhal. A transmissão de *Mycobacterium* sp, ocorre via transplacentária ou através da ingestão de leite de vacas infectadas, permitindo a disseminação via hematogênica possibilitando a ascendência para o sistema nervoso central (ORUÇ, 2005; DEL FAVA *et al.*, 2010; DOMINGO *et al.*, 2014).

Na glândula mamária, a tuberculose manifesta-se inicialmente com tumefação indolor difusa ou localizada. Posteriormente progride com a formação dos granulomas, principalmente nos quartos posteriores, com hipertrofia da glândula, que pode resultar em alterações visíveis no leite e queda na produção (NASSAR *et al.*, 2005; WATERS, 2015). O isolamento de *M. bovis* da glândula mamária ratifica o potencial risco desta enfermidade para a saúde pública, particularmente em algumas cidades do interior, onde ainda é frequente o consumo do leite cru e derivados não pasteurizados (PENAFORTE JÚNIOR *et al.*, 2009).

Geralmente nas lesões tuberculosas verificam-se granulomas constituído por zona central com intensa necrose caseosa, calcificação distrófica com focos de mineralização, circundado por intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epitelióides. Também são visualizadas células multinucleadas, com núcleos dispostos na região periférica e como resultado dessa fusão, as células gigantes tipo *Langhans* (WANGO *et al.*, 2005; FRANÇA *et al.*, 2013; ANDREAZZA *et al.*, 2015).

3.2.6 Diagnóstico

3.2.6.1 Teste alérgico-cutâneo

O diagnóstico indireto da tuberculose bovina é realizado por meio de testes alérgico-cutâneos com tuberculinas, sendo considerado o instrumento básico para programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo (BRASIL, 2017).

As tuberculinas disponíveis são extratos antigênicos de proteínas purificadas ou PPD (*Purified Protein Derivative*) produzidas a partir da amostra AN5 de *M. bovis* (PPD bovino) e de amostra D4 de *M. avium* (PPD aviário). O animal infectado e portanto sensível a tuberculina, responde sob a forma de reação alérgica, mediada por células e classificada como reação de hipersensibilidade tardia do tipo IV (MONAGHAN *et al.*, 1994; TIZARD, 2014).

No Brasil, conforme preconizado pelo Regulamento Técnico do PNCEBT, são utilizados testes alérgicos de tuberculinização intradérmica, como o Teste da Prega Caudal, o Teste Cervical Simples e Teste Cervical Comparativo, apresentando este último maior especificidade em relação ao teste simples, sendo utilizado como teste confirmatório (BRASIL, 2017).

No Brasil, a tuberculose bovina é endêmica e acomete grande parte das propriedades leiteiras. Um fator preocupante para o rebanho regional diz respeito ao elevado percentual de animais falso-negativos no teste da tuberculinização (anérgicos), que pode ocorrer em animais em processo avançado ou estado terminal da doença, sendo constante fonte de infecção para o restante do rebanho (IZAEL *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

3.2.6.2 Bacteriológico

O isolamento e identificação de *M. bovis* por meio do cultivo microbiológico é considerado prova padrão ouro. Porém o sucesso no cultivo depende das condições assépticas da colheita, do tempo e do acondicionamento da amostra. Antes do cultivo, as amostras devem ser submetidas ao processo de descontaminação, uma vez que os espécimes clínicos coletados (fragmentos de órgãos, linfonodos) proporcionam um meio rico em nutrientes para o crescimento mais rápido de outros microrganismos menos exigentes, ao contrário de *Mycobacterium* sp que é extremamente exigente em relação a nutrientes, quando comparados a outras bactérias. O objetivo da descontaminação é inativar outras bactérias presentes na amostra, evitando o crescimento mais rápido e esgotando os nutrientes do meio, tornando o crescimento do *M. bovis* inviável. A descontaminação constitui uma etapa indispensável no cultivo de *M. bovis* (BALIAN *et al.*, 2002; AMBROSIO *et al.*, 2008).

Diferentes protocolos de descontaminação são utilizados. Os métodos mais comuns são o de Petroff, o cloreto de 1- Hexadecilpiridínio (HPC), o ácido sulfúrico, o lauril sulfato de sódio, o ácido oxálico e Corper e Stone modificado (fosfato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20%). Existe ampla variedade de soluções e concentrações de substâncias químicas que objetivam a máxima inativação da microbiota presente nas amostras e a mínima injúria às micobactérias presentes. O método tradicionalmente utilizado para o isolamento de *M. bovis* provenientes de amostras de tecido bovino é o método de Petroff, considerado o mais sensível e relativamente barato. O HPC também tem apresentado bons resultados, revelando baixa toxicidade para as micobactérias (AMBROSIO *et al.*, 2008).

Os meios utilizados no isolamento de *M. bovis* devem conter piruvato de sódio como nutriente energético, pois, diferente da maioria das micobactérias, como *M. tuberculosis* que consome o glicerol para obter energia, o bacilo bovino utiliza o piruvato como fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Esta diferença metabólica de *M. bovis* é resultado de uma mutação no gene que codifica para a enzima que metaboliza o glicerol, refletindo um defeito no metabolismo do glicerol o que resulta em baixo crescimento bacteriano em meios que não contenham piruvato (KANTOR *et al.*, 2008).

A pesquisa de micobactérias por coloração de Ziehl-Neelsen para a visualização de BAAR apesar de ser amplamente utilizada, devido a praticidade e custo, apresenta limitações, como baixa sensibilidade e não distingue os membros da família *Mycobacteriaceae*, entre

outros como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (PRITCHARD, 1988; BRASIL, 2008).

O estudo desenvolvido por Furlanetto *et al.* (2012) teve como objetivo a utilização de métodos complementares de diagnóstico (histopatológicos, bacteriológicos e moleculares) na inspeção de lesões suspeitas de tuberculose observadas durante a inspeção *post-mortem* de rotina em abatedouros. Os resultados indicaram que podem ocorrer equívocos durante o julgamento das lesões, principalmente as que possuem poucos bacilos, uma vez que não apresentam características clássicas de tuberculose, possivelmente devido ao fato dos animais doentes serem abatidos de forma precoce e com infecção recente, gerando distorção nas estimativas da tuberculose nos abatedouros.

Trabalho realizado por Franco *et al.* (2017) a partir da colheita de linfonodos de bovinos durante o exame *post-mortem* em matadouro sob serviço de inspeção federal no estado de São Paulo, identificou 100 linfonodos com lesões caseosas sugestivas de tuberculose. Após processo de descontaminação, foram semeados nos meios de cultivo Stonebrink e Lowenstein-Jensen. Após o período de incubação de 90 dias, foi observado crescimento bacteriano em 67 isolados e classificados com base nas características fenotípicas como colônias de coloração creme amareladas, pequenas, arredondadas, bordas irregulares e superfície granular, compatíveis com *Mycobacterium* sp e posteriormente confirmados por provas moleculares como *M. bovis*.

3.2.6.3 Molecular

Os primeiros estudos empregando Reação em Cadeia de Polimerase para a detecção direta de *M. bovis* em tecidos bovinos foram realizados na década de 90, apresentando como vantagens a rapidez e a habilidade para detectar bacilos inviáveis. Esse ensaio, porém, apresentava limitações, provavelmente relacionadas ao método de extração, principalmente, para a detecção de *M. bovis* em amostras paucibacilares, onde o cultivo mostrava sensibilidade muito superior (ABRAHÃO, 1998).

O desenvolvimento da técnica de PCR, que permite a amplificação de segmentos gênicos foi um dos principais avanços tecnológicos nas últimas décadas, auxiliando o estudo da expressão gênica e o diagnóstico de doenças genéticas, neoplásicas e infecciosas. A técnica de PCR tem sido uma ferramenta valiosa entre os métodos de diagnóstico, revelando alta

especificidade, sensibilidade, rapidez e capacidade de detectar quantidades pequenas de DNA bacteriano na amostra (ABRAHÃO, 1998; RUGGIERO, 2007).

O interesse pelos métodos moleculares de diagnóstico tem crescido devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da doença, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste alérgico-cutâneo e o longo período de tempo para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos. No entanto, o cultivo microbiológico é considerado como prova padrão ouro no diagnóstico da tuberculose (DREWE; SMITH, 2014).

3.2.6.3.1 Genoma e evolução de *Mycobacterium bovis*

A cepa *M. bovis* AF2122/97 é altamente virulenta e foi isolada na Grã-Bretanha em 1997 (GORDON *et al.*, 1999). O sequenciamento genômico revelou que *M. bovis* possui 4.345.493 pares de base (pb) com conteúdo de guanina e citosina de 65% em média. O genoma de *M. bovis* apresenta 99,95% de similaridade com *M. tuberculosis*, mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. Apesar da similaridade genética com *M. tuberculosis*, o genoma de *M. bovis* tem sido reduzido devido a deleções, eventos considerados únicos e unidirecionais nessas bactérias (GARNIER *et al.*, 2003).

Estas deleções podem remover genes que são dispensáveis para a adaptação de hospedeiros e conduzir para uma gama de hospedeiros diferentes. Mutações pontuais também desempenham papel na definição do fenótipo, como no caso da resistência de *M. bovis* à pirazinamida e também a mutação do gene da piruvato quinase que torna *M. bovis* incapaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono (KEATING *et al.*, 2005).

A constituição populacional de *M. bovis* é estruturada de forma irregular, que consiste de uma série de grandes e pequenos complexos clonais (SMITH, 2003). Complexos clonais são grupos de cepas descendentes de uma única célula que foi o ancestral comum mais recente desse complexo e que apresentam todas as características derivadas desse ancestral. Nos membros do complexo *M. tuberculosis* não há troca de material genético entre linhagens (SMITH, 2011).

A baixa diversidade de sequências das espécies do complexo *M. tuberculosis* sugere que homoplasias (duas linhagens desenvolvem a mesma característica de forma independente) causadas por mutações repetidas não sejam observadas, a não ser que o *locus* esteja evoluindo

sob alguma forma de pressão seletiva, como por exemplo, genes que conferem resistência a antibióticos (SMITH, 2011).

A frequência com que alguns clones se originam na população pode ser explicada, principalmente pela seleção. A irregularidade observada na estrutura global da população de *M. bovis* e o domínio de clones individuais podem ser resultado de um efeito recente, ou seja, um clone sendo introduzido em um novo habitat e multiplicando-se na ausência de competição (SMITH *et al.*, 2003; SALES, 2012).

Embora cepas bacterianas da mesma espécie expressem genomas quase idênticos, diferenças ocorrem em alguns *locus*. O princípio da epidemiologia molecular é que cepas relacionadas epidemiologicamente (surto de origem comum) mostrarão genética idêntica ou perfis muito semelhantes ao passo que os isolados não relacionados (fontes distintas) terão padrões divergentes. Os métodos de genotipagem molecular mais comuns recorrem à amplificação por PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem de marcador epidemiológico, mas com potencial polimórfico para diferenciar cepas sem relação epidemiológica. A base de todas as técnicas de genotipagem molecular é a identificação de mutações genéticas estáveis que foram adquiridas ao longo do tempo, gerando perfis únicos entre as linhagens (DREWE; SMITH, 2014).

Para a diferenciação de cepas do complexo *M. tuberculosis*, a maioria das técnicas de genotipagem são baseadas no estudo de todo o genoma ou em sequências do genoma. As técnicas que envolvem a análise de todo o genoma, possuem a vantagem da obtenção de todas as informações genéticas. O sequenciamento genômico emprega técnicas de sequências repetidas específicas que compreendem as sequências de inserção (IS), regiões de repetições diretas (DR) e os *loci* de repetições em sequências (RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012).

A maioria das mudanças encontradas no genoma da espécie *M. tuberculosis* está associada a elementos móveis conhecidos como sequências de inserção (IS), constituídas por pequenos fragmentos de DNA capazes de se inserir no genoma das bactérias, conferindo polimorfismo entre as cepas (BROSCH *et al.*, 2002; AMADIO *et al.*, 2005). A diferença na localização e número de cópias desta sequência de inserção no genoma é a origem do polimorfismo entre isolados. Na espécie *M. tuberculosis* o número de cópias na sequência de inserção IS6110-RFLP é geralmente elevado, sendo maior que vinte e cinco cópias, conferindo elevado poder discriminatório desta técnica para esta espécie. Porém, devido a maioria dos isolados de *M. bovis* apresentarem poucas cópias de IS6110, a técnica proporciona limitada discriminação para esta espécie (ARANAZ *et al.*, 1996; KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Kasai *et al.* (2000) estabeleceram a diferenciação molecular das espécies do complexo *M. tuberculosis* a partir da análise do polimorfismo nos fragmentos de restrição (RFLP) do gene *gyrB*, que codifica a subunidade β da enzima DNA girase, envolvida nos processos de multiplicação bacteriana, sendo universalmente distribuída entre estes microrganismos. O método do *gyrB* RFLP é baseado na digestão do DNA genômico bacteriano através de enzimas de restrição, gerando posteriormente fragmentos de diferentes comprimentos (CHIMARA *et al.*, 2004).

O método de tipagem molecular consiste na variação da sequência de DNA no genoma bacteriano denominado RFLP-IS6110 e é baseado na digestão do DNA genômico por enzimas de restrição, as endonucleases, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos são separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA (COLLINS, 2011).

Entre as técnicas de genotipagem mais utilizadas para o estudo do complexo *M. tuberculosis* destacam-se as técnicas de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR. O estudo do número variável de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRU-VNTR) apresenta maior poder discriminatório e tem sido atualmente o método de eleição nos estudos de genotipagem de *Mycobacterium* (KAMERBEEK *et al.*, 1997; SUPPLY *et al.*, 2006).

Essas metodologias permitem comparar sequências do genoma de micobactérias, identificando similaridades genéticas dentre as linhagens de *M. bovis* circulantes em um rebanho e/ou regiões geográficas. A associação dos métodos de tipagem molecular tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular da espécie *M. tuberculosis*, conferindo reprodutibilidade e confiabilidade (KAMERBEEK *et al.*, 1997; SUPPLY *et al.*, 2006).

3.2.6.3.2 *Spoligotyping*

O *Spoligotyping* surgiu com objetivo de determinar a epidemiologia molecular da tuberculose humana, baseada na amplificação por PCR do DNA presente no *locus*, denominado de região de repetição direta (DR) presente no genoma de micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Posteriormente, a técnica foi padronizada para *M. bovis*, sendo considerado um método simples, rápido e adequado para inquéritos epidemiológicos (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Cada região DR corresponde a repetição regular de dois tipos de pequenas sequências. As sequências idênticas, chamadas de DR e as sequências que são todas diferentes, chamadas

de espaçadores. O resultado é obtido mediante a hibridação ou não de cada sequência espaçadora. Ao comparar as regiões DR de vários isolamentos, notou-se que a ordem dos espaçadores era praticamente a mesma em todos os isolados, as diferenças encontravam-se na ocorrência de deleções e inserções dos espaçadores. Portanto, o polimorfismo dos isolados é comprovado pela presença ou ausência de um ou mais espaçadores (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

A metodologia do *Spoligotyping* envolve duas etapas. A primeira consiste na amplificação, por PCR, dos espaçadores presentes entre as regiões DR. A segunda etapa consiste em revelar quais espaçadores foram amplificados nos isolados em estudo (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Na técnica clássica do *Spoligotyping* 43 diferentes oligoespaçadores estão ligados à membrana e teoricamente, 43 diferentes caracteres estão disponíveis para qualquer isolado, ou seja, é capaz de detectar a presença ou ausência de 43 espaçadores. Para algumas espécies, alguns espaçadores estão ausentes, permitindo a sua diferenciação. No caso de *M. bovis*, os espaçadores 3, 9, 16, 39 - 43 estão sempre ausentes (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

O *Spoligotyping* permite detectar e tipificar os membros do complexo *M. tuberculosis*, assim como distinguir especificidades geográficas entre os seus spoligotipos, relacionando-os a uma determinada população, região geográfica e até a própria história da dispersão da tuberculose (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Os perfis encontrados são analisados em banco de dados internacional www.mbovis.org e www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE conferindo a identificação de *M. bovis*, permitindo análises, comparações genéticas e epidemiológicas dos perfis encontrados em diferentes regiões, possibilitando melhor compreensão da dinâmica da tuberculose (FILLIOL *et al.*, 2002).

É provável que a tuberculose na forma de surtos ou focos, esteja relacionado a diversidade genotípica de *M. bovis*, possivelmente relacionado a compra de animais infectados de outras propriedades ou infecção simultânea de rebanhos vizinhos. A transmissão entre bovinos possui relevância significativa para a manutenção da doença no rebanho, portanto, informações a respeito da tipificação de cepas de *M. bovis*, registro e observação da movimentação dos animais entre as propriedades, podem ser valiosas na epidemiologia da tuberculose em diferentes países (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013).

➤ *Caracterização de M. bovis isolados de bovídeos*

Diversos estudos objetivando a caracterização genotípica de cepas de *M. bovis* foram realizados. No Brasil, alguns espoligotipos têm sido registrados com maior frequência, como o SB0120, SB0121 e o SB0295.

Pesquisa realizada por Parreiras *et al.* (2012) identificou 61 isolados de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de TB. Os isolados foram classificados em 17 padrões diferentes, como o espoligotipo SB0295 (29,5%), SB0121 (23%) e o SB0120 (4,9%). No estado do Rio de Janeiro, foram identificados 12 isolados de *M. bovis*, de 34 bovinos positivos ao teste de tuberculinização, entre eles o SB0120 (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

Rocha *et al.* (2012) identificou 116 isolados de *M. bovis* provenientes de focos de tuberculose no estado de São Paulo, registrando os espoligotipos SB0295 (35,34%) e SB0121 (32,76%) entre os mais prevalentes.

No estado do Rio Grande do Sul, quatro diferentes espoligotipos foram obtidos de 85 isolados de *M. bovis*. Dentre os espoligotipos classificados, o SB0121 foi o mais prevalente, formando um agrupamento (*cluster*) de 79 isolados, correspondendo a 93% das cepas de *M. bovis* (RAMOS *et al.*, 2014). No estado da Bahia, foram classificados 14 isolados de bovinos provenientes de abatedouro, caracterizando oito espoligotipos diferentes, entre eles, SB0121 e SB0295 (ALZAMORA FILHO *et al.*, 2014).

O espoligotipo SB0121 também foi identificado no estado do Mato Grosso do Sul, por Cazola *et al.* (2015). Na região centro oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) foi realizado estudo de caracterização com isolados de *M. bovis* obtidos 37 bovinos com reação positiva ao teste de tuberculinização, sendo identificados 10 perfis diferentes de espoligotipos, seis isolados formando *clusters*, como SB0121 (37,8%) SB0295 (16,2%) e SB0140 (16,2%) como mais prevalentes, e quatro espoligotipos classificados como perfis únicos (CARVALHO *et al.*, 2016).

Franco *et al.* (2017) caracterizaram 67 isolados de *M. bovis* obtidos de linfonodos de bovinos da região sudeste de São Paulo, provenientes de abatedouros. Classificando 16 diferentes padrões de espoligotipos, entre eles o SB0295 (26,8%) e SB0121 (25,3%) como mais prevalentes.

Estudo foi desenvolvido na região norte do Brasil, com a finalidade de identificar *M. bovis* em búfalos e bovinos dos estados do Amazonas e Pará e analisar a diversidade genotípica

dos isolados. O método de *Spoligotyping* classificou 6 diferentes perfis, no entanto, os espoligotipo SB0121 e SB0295 foram comuns apenas aos búfalos (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Estudo de distribuição e caracterização dos espoligotipos foi realizado em alguns países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, México e Venezuela) sendo classificados 269 espoligotipos. Destes, foram identificados no Brasil, 51 perfis de espoligotipos, sendo o SB0121 o mais prevalente com (29,1%), SB0295 (24%) e SB0120 (6,3%) (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013).

A caracterização molecular de isolados de *M. bovis* de bovinos na Argélia identificou os padrões SB0120 e SB0121 como os mais frequentes dentre as cepas identificadas. A similaridade de cepas observada entre a Argélia e alguns países da Europa, provavelmente ocorreu devido a importação de animais, presente desde a colonização, e continua sendo prática constante com o objetivo de aumentar e potencializar o rebanho de gado altamente produtivo (SAHRAOUI *et al.*, 2009).

O espoligotipo SB0121 foi registrado em rebanhos bovinos em vários países, como México, Portugal, Argélia, França, Espanha, Itália e no Continente Africano. Nos países em que os dois espoligotipos SB0121 e SB0120 são comuns, como na Espanha, Portugal, França e Itália a semelhança de espoligotipos provavelmente está relacionada a proximidade geográfica e relação comercial (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

Algumas hipóteses tentam explicar a abundância do espoligotipo SB0121, uma delas é que esta cepa possua vantagem evolutiva sobre outras. Por outro lado, a evolução das regiões diretas (DR) é unidirecional, ocorrendo deleções de espaçadores individuais ou perda de sequências de espaçadores, considerando o SB0120 que seria o antepassado (ancestral) comum, a partir do qual o SB0121 evoluiu pela perda do espaçador 21, dando origem a grande diversidade populacional de *M. bovis* (HADDAD *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

Os espoligotipos SB0120 e SB0121 são os perfis mais comuns já registrados em todo mundo, assim, fatores como alta transmissibilidade e patogenicidade podem estar relacionada a ampla distribuição das duas cepas (GHAVIDEL *et al.*, 2018).

A comparação de perfis moleculares específicos de cepas entre isolados de humanos e animais podem fornecer informações importantes, principalmente relacionadas as fontes de infecção e vias de transmissão ao homem.

➤ *Caracterização de M. bovis isolados de humanos*

Na Itália, foi realizado um estudo com isolados clínicos de *M. bovis* de 38 pacientes italianos e 9 pacientes estrangeiros, totalizando 47 isolados. O espoligotipo prevalente foi o SB0120 (63,8%), destes 9 foram classificados como *M. bovis* BCG. A grande maioria dos isolados de *M. bovis* revelaram perfis moleculares individuais (únicos) apesar de relacionados geneticamente, e além dos isolados BCG submetidos a uma filogenia diferente, apenas 1 grupo de isolados idênticos de *M. bovis* (SB0120) foi detectado, o que sugere a possibilidade de um surto de tuberculose bovina na área geográfica de estudo (LARI *et al.*, 2011).

Outro estudo semelhante realizado na Zâmbia, visando a caracterização de *M. bovis* em humanos portadores de tuberculose pulmonar e nos bovinos da região, foi realizado utilizando como espécimes clínicos o escarro e lesões no exame *post-mortem*, respectivamente. Na região estudada, o contato próximo dos bovinos com a população, assim como o consumo frequente de leite cru são fatores de risco que potencializam a transmissão da infecção. No entanto, o estudo revelou entre os pacientes portadores de tuberculose pulmonar, dois isolados de *M. bovis*. Sendo observado que humanos e bovinos compartilhavam da mesma estirpe de *M. bovis* o espoligotipo SB0120, provavelmente devido ao contínuo consumo do leite cru (MALAMA *et al.*, 2014).

Os estudos de tipagem molecular tem contribuído significativamente na compreensão da epidemiologia da tuberculose bovina e humana. O compartilhamento de isolados comuns de *M. bovis* entre humanos e bovinos, tendo como fator de risco em comum o consumo de leite cru, potencializa o papel zoonótico de *M. bovis* como agente causador da tuberculose humana (MALAMA *et al.*, 2014).

A expansão clonal de *M. bovis* destaca o efeito deletério da introdução de uma doença infecciosa transmissível, podendo acarretar epidemia crescente na vida selvagem e enfatiza a importância do controle da doença e restrição da movimentação de espécies que atuam como reservatórios. A introdução pontual de fontes de uma cepa de *M. bovis* em um ecossistema em um parque na África do Sul, resultou em um surto que afetou várias espécies. Nesse estudo o espoligotipo SB0121 foi identificado nos isolados de búfalos, leões e leopardos (DIPPENAAR *et al.*, 2017).

Um estudo recente foi realizado na Tunísia avaliando a diversidade genética de pacientes com tuberculose extrapulmonar. No total 110 pacientes fizeram parte do estudo. Assim, 105 isolados foram classificados com *M. bovis*, classificando 13 padrões de

espoligotipos. Os espoligotipos SB0120, SB0121 e SB2025 foram os três mais predominantes identificados. O mais frequente dentre os isolados referenciou o espoligotipo SB0120 (SIALA *et al.*, 2019). Os espoligotipos caracterizados nos bovinos foram os mesmos identificados nos pacientes, com prevalência também do espoligotipo SB0120 (DJEMAL *et al.*, 2017). Vale ressaltar que os espoligotipos observados nos isolados e compartilhados com os bovinos foram associados principalmente a pacientes que consumiam leite cru e possuíam contato direto com os bovinos, respectivamente SB0120 (23/29) e SB0121 (14/21). Esses resultados destacam o potencial zoonótico da tuberculose bovina (SIALA *et al.*, 2019).

O *Spoligotyping* apresenta algumas vantagens como rápida execução e boa reprodutibilidade, permitindo a análise de um grande número de isolados e diferenciação para análise epidemiológica das espécies do complexo *M. tuberculosis*.

Alguns estudos relatam que apenas o *Spoligotyping* não seria suficiente para todas as correlações epidemiológicas entre as cepas de *M. bovis*, havendo a necessidade de associações com outros métodos moleculares com maior poder discriminatório (KAMERBEEK *et al.*, 1997), entre eles o estudo do número variável de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias - MIRU-VNTR (SUPPLY *et al.*, 2006).

3.2.6.3.3 MIRU-VNTR

Sequências repetitivas em *tandem* foram observadas pela primeira vez no genoma de eucariotos. Sua distribuição no genoma se mostrou bastante dispersa e as sequências foram relatadas com um grande número de cópias. Os *loci* com pequenas sequências repetidas de 1-13 pb foram identificadas como microssatélites e outros com sequências repetidas de 10-100 pb como minissatélites (TAUTZ; RENZ, 1984; TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994). Muitos destes *loci* possuem hipervariabilidade em seus números de repetições e são denominadas de *loci* de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*). Os VNTRs surgiram como marcadores valiosos para a genotipagem de várias espécies bacterianas, como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* e os membros do complexo *M. tuberculosis* (SUPPLY *et al.*, 1997; LE FLÈCHE *et al.*, 2001).

Supply *et al.* (1997) identificaram 29 *loci* de VNTR presentes no genoma dos membros do complexo *M. tuberculosis*, denominado de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitis* (MIRU), sendo semelhantes às sequências de minissatélites descritas no genoma humano. Posteriormente Supply *et al.* (2000) pesquisando o genoma da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*,

identificou 12 novos *loci* além dos 29 anteriormente identificados. Os MIRUs são considerados importantes marcadores para os estudos de evolução e relações filogenéticas.

Supply *et al.* (2006) analisou isolados do MTBC de várias partes do mundo. O resultado deste estudo permitiu padronizar um conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR, incluindo um subconjunto de 15 *loci* bastante discriminatório, para ser usado como um método de tipagem de primeira linha. Este conjunto de 24 *loci* demonstrou eficiência na discriminação de isolados de *M. tuberculosis* em relação ao conjunto de 12 *loci* originalmente sugeridos, com resultados altamente reproduzíveis.

A tipagem MIRU-VNTR visa *loci* genéticos que estão distribuídos por todo genoma, esses *loci* contém uma variação na quantidade de sequências repetidas. O polimorfismo nos *loci* pode ocorrer a partir da mudança na sequência dos nucleotídeos, como na variação no número de unidades repetidas, conseqüentemente criando uma variação alélica. A tipificação pelo MIRU-VNTR tem como base o polimorfismo dos números das sequências repetidas organizadas em sequências no DNA (VAN BELKUM *et al.*, 1998).

Para o conhecimento das sequências repetidas, é realizada a PCR utilizando pares de iniciadores específicos (um para cada MIRU-VNTR) para as regiões com o objetivo de amplificar individualmente os *loci* e determinação do número de repetições em cada *locus*. Posterior à amplificação, é determinado o tamanho (de acordo com o tamanho molecular em pares de base) do produto amplificado por eletroforese de acordo com os marcadores de pares de base utilizados. A interpretação dos resultados é realizada utilizando uma tabela alélica, que relaciona o peso molecular obtido com o número de alelos repetidos em cada *locus*. O resultado da tipagem é expresso em código numérico, que corresponde ao número de repetições do *locus* alvo, como uma impressão digital do respectivo isolado (BEER *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-CAMPOS, 2012).

Após a determinação do perfil alélico para cada cepa, os dados são analisados empregando um aplicativo web MIRU-VNTR *plus* (www.miru-vntrplus.org). O banco de dados permite a análise do perfil de alelos dos isolados com os isolados de diferentes regiões do mundo, representando as principais linhagens do complexo *M. tuberculosis* (ALLIX-BEGUEC *et al.*, 2008).

O polimorfismo dos *loci* é avaliada de acordo com a diversidade alélica encontrada em cada *loci* de MIRU-VNTR. Com base nesse índice, o *locus* é considerado altamente polimórfico/discriminatório se $h > 0,6$; moderado se $0,3 \leq h \leq 0,6$ e baixo se $h < 0,3$ (SOLA *et al.*, 2003).

O MIRU-VNTR é considerado prova padrão ouro na genotipagem das espécies de *Mycobacterium* (complexo), apresentando alto poder discriminatório e reprodutibilidade. Suas unidades de repetição estão dispersas por todo genoma das cepas de *Mycobacterium*, com mutações variáveis de cada *locus*. O polimorfismo das cepas é baseado na variabilidade do número de cópias de cada unidade de repetição (SUPPLY *et al.*, 2006; WENIGER *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Souza Filho *et al.* (2013) com base no padrão de 24 *loci* MIRU-VNTR, caracterizou 22 perfis genéticos distintos no total de 55 isolados (13 perfis com agrupamentos e nove isolados com perfis únicos) conferindo elevado poder discriminatório (HGDI 0.912) aos 24 *loci* estudados. A heterogeneidade dos perfis genéticos confirmam a alta diversidade genética entre as linhagens de *M. bovis* circulantes na região estudada, geralmente justificada devido a movimentação dos animais entre diferentes regiões, estados e propriedades rurais (CARVALHO *et al.*, 2016). A similaridade de cepas presentes com cepas de outros continentes, depositadas no banco de dados, são justificadas pela importação de animais e evolução clonal de *M. bovis* (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013).

Carvalho *et al.* (2016), utilizando o conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR em 37 isolados de *M. bovis* na região centro-oeste do Brasil, estabeleceu o agrupamento de 6 *clusters* e 22 isolados com perfis únicos. O conjunto estabelecido de 24 *loci* de MIRU-VNTR configurou um elevado poder discriminatório (0.982) comparado a técnica do *Spoligotyping* (0.810). A principal limitação do *Spoligotyping* está relacionado aos polimorfismos genéticos restritos a um locus genômico, a região DR.

A caracterização genotípica de isolados de *M. bovis* utilizando a técnica de *Spoligotyping* e o conjunto de 12 *loci* MIRU-VNTR permitiu o agrupamento em 12 *clusters* (46 isolados) e 21 isolados de perfis únicos, na pesquisa realizada por Franco *et al.* (2017).

Estudo de caracterização genotípica foi realizado no Canadá com isolados de *M. bovis* de espécies domésticas e selvagens, provenientes do banco de dados do Programa de controle e erradicação da tuberculose bovina e Programa de Vigilância da vida selvagem. Um total de 137 isolados de *M. bovis* foram caracterizados pelo *Spoligotyping* e 24 *loci* MIRU-VNTR. Foram registrados 13 genótipos distintos e caracterizados 7 *espilgotipos*. Os resultados da genotipagem demonstraram baixa variabilidade genética das cepas de *M. bovis*. No entanto, o *Spoligotyping* e especialmente o MIRU-VNTR são ferramentas uteis para auxiliar as investigações epidemiológicas e estratégias de controle e erradicação (ANDRIEVSKAIA *et al.* 2018).

A caracterização genotípica dos isolados de bovinos provenientes de 10 distritos em Moçambique foi realizada utilizando as técnicas de *Spoligotyping* e 24 *loci* MIRU-VNTR.

Entre as cepas identificadas no estudo, o espoligotipo SB0120 estava presente em todos os distritos. A diversidade de cepas de *M. bovis* na África não parece ser em função da importação recente de animais, mas provavelmente é mantida dentro de cada região, em particular pela reinfecção constante dos animais reservatórios. Existe um elevado risco de tuberculose zoonótica à população da África, ainda subestimado e de grande magnitude em virtude do surgimento de cepas multirresistentes de *M. bovis* (MACHADO *et al.*, 2018).

O estudo realizado na Tunísia sobre a caracterização genotípica dos isolados de *M. bovis* de pacientes com tuberculose extrapulmonar, utilizando a técnica de *Spoligotyping*, 7 padrões de espoligotipos e pelo MIRU-VNTR, utilizando 8 *loci*, caracterizou 60 perfis. A tipagem molecular pelo MIRU-VNTR apresentou elevado poder discriminatório e elevada diversidade alélica entre 6 *loci* (8) utilizados (SIALA *et al.*, 2019).

Os *loci* apresentam capacidade discriminatória individual tanto para isolados de *M. tuberculosis* quanto para isolados de *M. bovis*, porém os *loci* apresentam menos polimorfismos no genoma de *M. bovis* (SUPPLY *et al.*, 2006).

O *Spoligotyping* e o MIRU-VNTR são técnicas moleculares amplamente empregadas em estudos epidemiológicos de tuberculose humana, bem como na tipificação molecular das espécies do complexo *M. tuberculosis* incluindo o *M. bovis*. Quando combinadas são capazes de distinguir com maior eficiência as linhagens micobacterianas com reprodutibilidade e confiabilidade (SUPPLY *et al.*, 2006; VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

Em virtude da alta reprodutibilidade e confiabilidade da técnica MIRU-VNTR, recomenda-se a utilização do conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR para estudo comparativo dos padrões (perfis) de *M. bovis* em todo mundo, configurando assim, um elevado poder discriminatório da técnica (GHAVIDEL *et al.*, 2018).

3.2.7 Controle

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose foi instituído com objetivo de reduzir a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose. Entre as ações de estratégias do PNCEBT estão o controle do trânsito de animais destinados à reprodução, padronização das técnicas de diagnóstico, destruição de animais positivos a prova de tuberculinização, melhoria na integração do serviço de defesa sanitária com o serviço oficial de inspeção de produtos de origem animal (BRASIL, 2017).

Devido ao potencial zoonótico da tuberculose e grande impacto à pecuária leiteira e de corte devido as perdas econômicas, vários países em todo mundo estabeleceram programas de controle visando a redução, controle e erradicação da tuberculose. Os programas bem estruturados e coordenados conseguem atingir bons níveis de controle, após aproximadamente um período de 20 anos de trabalho. Os programas são laboriosos, demandam ações bem coordenadas dos serviços oficiais e privados, e que resultam não só na eliminação das doenças, como também a organização, fortalecimento e amadurecimento dos serviços de defesa sanitária animal e a modernização das cadeias produtivas de carne e leite (FERREIRA NETO *et al.*, 2009).

Em 2017, através da Instrução Normativa n. 10, de 3 de março de 2017, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) foi revisado, sendo acrescentado critérios mínimos para o saneamento de propriedades com animais infectados, estabelecendo métodos para classificar as unidades federativas segundo suas prevalências e ações implementadas (BRASIL, 2017).

Objetivando o planejamento de estratégias de intervenção, a caracterização genotípica das cepas de *M. bovis* por meio do estudo da genotipagem molecular, constitui importante ferramenta para elaboração de programas de combate e controle da tuberculose bovina, acarretando resultados promissores que estão diretamente relacionados a tuberculose zoonótica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença n. 09/2017 CEPE/ UFRPE de acordo com as normas do COBEA e *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

4.1 LOCAIS DE CONDUÇÃO DO ESTUDO

O trabalho foi desenvolvido na Clínica de Bovinos de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro e o Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu, SP.

4.2 ANIMAIS

Fizeram parte deste estudo, 30 bovídeos (28 bovinos e 02 bubalinos) atendidos na Clínica de Bovinos de Garanhuns/UFRPE apresentando sintomatologia clínica sugestiva de tuberculose.

Os animais foram submetidos ao exame clínico seguindo as recomendações de Dirksen *et al.* (1993), sendo as informações, inclusive epidemiológicas, assinaladas nos prontuários clínicos. Entre as informações, fornecidas na anamnese pelos proprietários, comuns a maioria dos animais, destacava-se a perda progressiva de peso, tosse seca e diminuição da produção leiteira.

Diante da evolução/gravidade dos casos clínicos e/ou do resultado do teste alérgico-cutâneo, os animais foram eutanasiados (LUNA; TEIXEIRA, 2007) de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2016) e submetidos ao exame anatomopatológico.

Fragmentos de órgãos e linfonodos com lesões características de granulomas foram coletados para o exame histopatológico e o cultivo microbiológico, respectivamente. As amostras destinadas à bacteriologia foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para posterior processamento de cultivo. Para avaliação histopatológica, os fragmentos foram fixados em formol tamponado 10%, processados e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

4.3 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Foram encaminhados para o cultivo microbiológico material (granulomas) de 30 bovídeos. O cultivo e isolamento de *M. bovis* foi realizado seguindo as recomendações de Franco *et al.* (2017). O processo de descontaminação das amostras foi realizado de acordo com o método de Petroff, descrito por Balian *et al.* (2002). Foi adicionado ao material macerado 5 mL de solução de NaOH a 4% e 0,1 ml da solução indicadora de pH azul de bromotimol a 0,02%, homogeneizado e o conteúdo incubado a 37°C por 30 minutos. A seguir, foi adicionado a cada tubo solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4% até a mudança de cor do indicador do azul para o amarelo, e estabilização do pH entre 6,5 e 7,4. Os tubos foram centrifugados a 6.708g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos com 5 ml de solução salina estéril e homogeneizados com auxílio de agitador de tubos. As suspensões foram submetidas à outra centrifugação a 6.708g por 20 minutos. A etapa de lavagem dos sedimentos em solução salina estéril foi repetida por duas vezes.

Após o processo de descontaminação das amostras, as mesmas foram inoculadas nos meios de cultura de Lowenstein-Jensen (BBL™ - *Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA*) e Stonebrink (preparação *in house*). O meio Stonebrink foi preparado com fosfato monopotássico, fosfato dissódico, piruvato de sódio, água destilada, solução verde malaquita a 2% e ovos. O meio Lowenstein-Jensen foi preparado com água destilada, glicerina PA e ovos. Após o preparo dos meios, foram distribuídos em garrafas plásticas estéreis de cultivo celular (volume de 40 mL) [*Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça*], colocados em estufa por 45 minutos a 85°C. Posteriormente, permaneceram a temperatura ambiente por 12 horas para resfriar. No dia seguinte, as garrafas de cultivo contendo os devidos meios foram colocados em estufa a 37° por 24 a 48 horas para teste de esterilidade. Sem qualquer contaminação aparente, os meios foram rotulados e armazenados sob refrigeração (temperatura entre 2°C e 8°C).

Os meios de cultura foram retirados da refrigeração e levados a câmara asséptica do laboratório, juntamente com o material a ser semeado. Com auxílio de alça bacteriológica estéril foi realizada a semeadura nas garrafas de cultivo celular e em seguida foram encaminhadas a estufa onde permaneceram incubadas a 37°C em condições de aerobiose.

Durante o período de incubação, as culturas foram inspecionadas semanalmente objetivando à detecção de crescimento micobacteriano. Após o período de 90 dias as garrafas de cultivo foram analisadas de acordo com as características fenotípicas, como morfologia e aspecto das colônias, tempo de multiplicação (crescimento) compatíveis com *Mycobacterium*

sp. Após a identificação, os 17 isolados permaneceram estocados nos próprios meios de cultura, até o momento da extração do DNA.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Para o procedimento de extração do DNA, as garrafas de cultivo foram levadas à câmara de fluxo laminar e as colônias foram extraídas com auxílio de alças bacteriológicas descartáveis. O conteúdo de cada alça bacteriológica foi colocado em microtubos de centrifuga estéreis contendo 300 µL de solução tampão Tris-EDTA (pH 8,0). Em seguida aquecidos a 100°C por 10 minutos e resfriados a -86°C por 10 minutos. O ciclo de aquecimento e congelamento foi repetido por três vezes. Os microtubos foram centrifugados a 13.201g sob refrigeração (4°C) por 20 minutos e o sobrenadante de cada microtubo foi então transferido para um novo microtubo estéril. O DNA extraído de cada isolado por termólise foi estocado a -20°C até o momento da realização das técnicas moleculares (MAZARS *et al.*, 2001).

4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A identificação molecular foi realizada por meio de PCR por amplificação do fragmento de 1020 pb do gene *gyrB*. Na reação foram empregadas 1µL de DNA (20 ng), 47µL de Master Mix (1x) (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) e 10 pMol de cada *primer* MTUBf (5' TCGGACGCGTATGCGATATC 3') e MTUBr (5' ACATACAGTTCCGGACTTGCG 3') [DNA Express Biotecnologia LTDA, Guarulhos, SP, Brasil]. O perfil de ciclagem consistiu em desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos (CHIMARA *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2017).

A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com GelRed™ (*Biotium, Hayward, CA, EUA*), com marcador molecular de 100 pb (DNA Express Biotecnologia LTDA, Guarulhos, SP, Brasil). Em seguida, 10 µL do produto amplificado foram submetidos à digestão pelas enzimas de restrição *RsaI*, *TaqI* e *SacII* (*Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*), seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com GelRed™, com marcadores

moleculares de 50 pb e 100 pb (DNA Express Biotecnologia LTDA, Guarulhos, SP, Brasil). Após a eletroforese, os géis foram fotografados em equipamento de fotodocumentação (2UV Transilluminator UVP). Os resultados encontrados foram comparados com os descritos por Chimara *et al.* (2004).

4.5.2 Genotipagem molecular

4.5.2.1 *Spoligotyping*

A tipificação molecular pelo *Spoligotyping* foi realizada como descrito por Kamerbeek *et al.* (1997). Inicialmente foi realizada amplificação por PCR da região DR, e para tal finalidade foram utilizados 1 µL (20 µM) de cada *primer* DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC 5' biotinylated) e DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC), My Taq Mix (12,5 µL), 1 µL (20 ng) DNA genômico, e água ultra pura (9,5 µL) obtendo volume final de 25 µL.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 3 min, 25 ciclos de amplificação a 96°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 min. O DNA de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv foram utilizados como controles positivos.

Para a hibridização, 20 µL dos produtos amplificados foram diluídos em 150 µL de solução SSPE 2x com 0,1% SDS, desnaturados a 100°C por 10 minutos e em seguida resfriados em banho de gelo.

A membrana contendo 43 sequências correspondentes aos espaçadores na região DR foi sensibilizada, sendo lavada com 250 µL de solução SSPE 2x com 0,1% SDS, por 5 min a 60°C. As amostras foram aplicadas na membrana perpendicularmente ao conjunto dos 43 oligonucleotídeos espaçadores. Os canais negativos foram preenchidos com 150 µL de solução SSPE 2x com 0,1% SDS, para que não ficassem vazios. O fluido residual foi aspirado com auxílio de bomba a vácuo. A hibridização ocorreu por 60 min a 60°C, em superfície horizontal e sem agitação, posteriormente, os canais de *miniblotter* foram aspirados em ordem e a membrana lavada por duas vezes em 250 mL solução SSPE 2x com 0,5% SDS a 60°C por 10 minutos.

A membrana foi resfriada e posteriormente adicionada à membrana 10 mL de solução SSPE 2x SDS 0,5% com 2,5 µL de estreptavidina conjugada com peroxidase (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) seguida da incubação da membrana a 42°C

por 60 minutos no forno de hibridização em movimento. Em sequência, a membrana foi submetida a duas lavagens com 250 mL de solução SSPE 2x com 0,5% SDS a 42°C por 10 minutos cada, e dois enxagues finais em 250 mL de SSPE 2X a temperatura ambiente por 5 minutos.

A membrana foi incubada em 15 mL com os reagentes de quimioluminescência, seguindo para sala escura o qual foi realizado filme radiográfico e a revelação empregando kit de reagentes reveladores e fixadores. Posteriormente, os perfis encontrados foram comparados com os bancos de dados <http://www.mbovis.org/> e http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ conferindo a identificação de *M. bovis* dos padrões espoligotipos (SB) e *Spoligotyping Internacional Type* (SIT) respectivamente.

4.5.2.2 MIRU-VNTR

A técnica do MIRU-VNTR foi realizada a partir da combinação de 24 *loci*, seguindo a recomendação descrita por Supply *et al.* (2006).

Em cada reação de PCR foram utilizadas 10 µL May Taq Mix (BIOLINE[®]), 0,4 µL de cada *primer* (20 mM), 2 µL de DNA (20 ng) e 7,2 µL de água ultra pura, no volume final de 20 µL. Também foram acrescentados DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e água, como controle positivo e negativo respectivamente.

Foi empregado um único protocolo de ciclagem para as reações de PCR: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 15 segundos, finalizando com 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5%, utilizando tampão de corrida TAE 1x (Tris, acetato e EDTA) e marcador molecular de 100 pb. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio. As imagens foram visualizadas e documentadas no sistema de fotodocumentação.

Posteriormente os tamanhos dos fragmentos encontrados foram avaliados com auxílio da tabela de conversão de Supply *et al.*, 2006, que relaciona o tamanho do fragmento obtido com a quantidade de cópias. Baseado na quantidade de alelos, cada amostra recebeu um código numérico que foi usado para descrever seu perfil genético. O perfil genético foi utilizado na comparação do perfil de cada isolado com cepas depositadas no aplicativo <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index>.

A diversidade alélica (h) de cada *locus* foi realizada seguindo a fórmula publicada por Selander *et al.*, (1986), sendo: $h = 1 - \sum x_i^2 [n / (n-1)]$, considerando x_i a frequência do alelo i no *locus* e n o número de isolados. Com base nesse índice, o *locus* é considerado altamente polimórfico/discriminatório se $h > 0,6$; moderado se $0,3 \leq h \leq 0,6$ e baixo se $h < 0,3$ (SOLA *et al.*, 2003).

A análise do poder discriminatório da técnica de tipagem MIRU-VNTR com 24 *loci* foi realizado seguindo a fórmula de Hunter-Gaston (1988):

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

Sendo N o número de (isolados) amostras em uma população, s o número total de tipos descritos e n_j o número de amostras pertencentes ao tipo j^{th} . A técnica é considerada eficiente, com alto poder discriminatório se apresentar índice de pelo menos 90%.

5 RESULTADOS

Os 17 bovídeos de aptidão leiteira dos quais *M. bovis* foi isolado eram provenientes de dez municípios do estado de Pernambuco (Alagoinha, Bom Conselho, Chã Grande, Garanhuns, Ibirajuba, Jurema, Pedra, Pesqueira, Ribeirão e Venturosa), criados em sua maioria no sistema de manejo semi-intensivo. Entre os animais diagnosticados com a enfermidade, as fêmeas foram as mais acometidas (16/17), já em relação a faixa etária, 64,7% (11/17) tinham idade superior a cinco anos, no entanto ressalta-se a positividade no isolamento em um (1/17) bezerro jovem de sete meses de idade.

O exame clínico dos bovinos e bubalinos revelou entre os principais sinais da enfermidade apatia, inapetência, baixo escore corporal, secreção nasal seromucosa, tosse seca, dispneia, taquipneia, polipneia, crepitações e áreas de silêncio nos campos pulmonares. Na avaliação da glândula mamária, dois (2/17) bovinos apresentavam os linfonodos hipertrofiados. Uma das vacas apresentava quarto mamário posterior aumentado, de consistência firme, com hiperemia e hipertermia e alterações físicas no leite em um dos tetos (soro com grumos). O outro bovino apresentava quarto mamário anterior de consistência firme, sem alterações visíveis no leite. No exame retal, em alguns animais, foi verificada a presença de estruturas nodulares de tamanhos variados e de consistência endurecida localizadas na região do mesentério, serosa de rúmen e útero.

As lesões macroscópicas visualizadas no exame *post-mortem* revelaram que 12/17 animais (70,6%) apresentavam tuberculose miliar ou protraída, distribuídas principalmente nos pulmões, linfonodos mediastínicos e traqueobrônquicos, fígado e linfonodos mesentéricos, e em menor frequência nos rins e no baço e omento maior. Dentre esses animais com tuberculose generalizada, dois bovinos também apresentavam alterações na glândula mamária e no útero, caracterizadas por lesões granulomatosas com distribuição multifocal e tamanhos variados, com áreas de calcificação e abscessos.

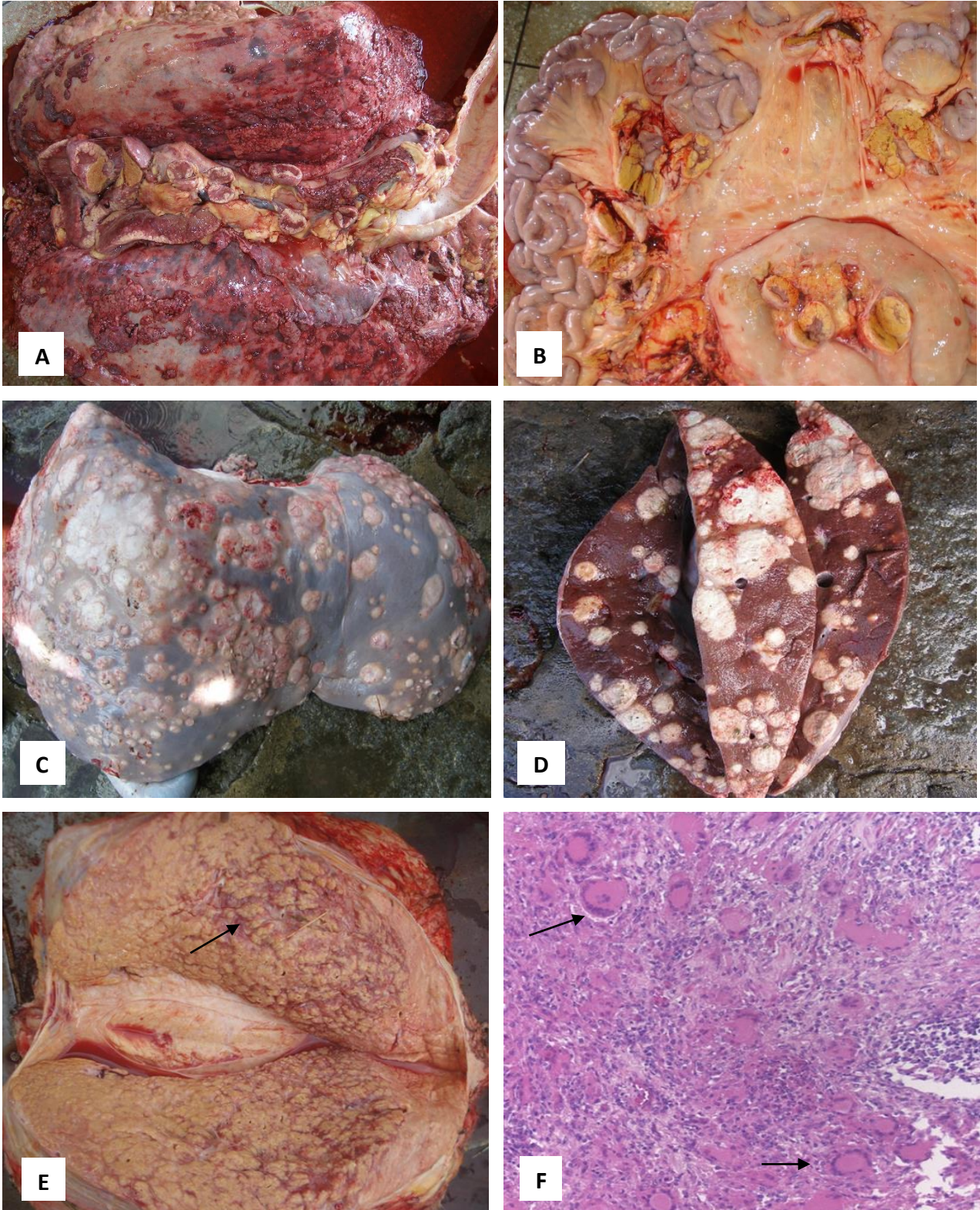
Os nódulos granulomatosos observados em todos os animais eram pleomórficos, apresentavam conteúdo de consistência caseosa, espessa e coloração amarelada, com formação de cápsula fibrosa (Figura 1). Nas búfalas os granulomas apresentavam coloração mais esbranquiçada quando comparado aos bovinos (Figura 1). No bezerro jovem, além das lesões pulmonares, foram observados pequenos granulomas no sistema nervoso central e lesões compatíveis com meningoencefalite.

A análise histopatológica das lesões revelou áreas de necrose caseosa central e calcificação distrófica, intensa reação inflamatória nas regiões adjacentes às áreas de necrose,

com predomínio de macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas, tipo *Langhans* (Figura 1).

O cultivo microbiológico revelou crescimento de colônias compatíveis com *Mycobacterium* sp em 17/30 (57%) amostras que foram confirmadas pelas técnicas moleculares como *M. bovis*. Outros microrganismos como *Trueperella pyogenes* foi identificado em três amostras (3/30) e *Nocardia* spp em uma amostra (1/30).

Figura 1 - Lesões granulomatosas distribuídas em pulmão e linfonodos mediastínicos (A) e linfonodos mesentéricos de bovinos (B). Lesões granulomatosas distribuídas no parênquima hepático de búfalos (C, D). Lesões nodulares granulomatosas no parênquima mamário bovino (E). Corte histológico do parênquima mamário bovino, revelando reação inflamatória com presença de células gigantes de *Langhans* (F).



Fonte: A autora, 2019.

As cepas de *M. bovis* caracterizadas neste estudo foram isoladas de bovídeos procedentes de três regiões geográficas do estado, agreste meridional, agreste Central e mata sul. A região do agreste meridional representada pelos municípios de Bom Conselho, Garanhuns, Jurema, Pedra e Venturosa apresentou a maior variedade de espoligotipos, os cinco perfis foram identificados nessa região. A região do agreste central, representada pelos municípios Alagoinha, Ibirajuba e Pesqueira, apresentou dois espoligotipos (SB0121) e (SB0295), e a região da mata sul, representada pelos municípios de Chã Grande e Ribeirão, apresentou dois espoligotipos (SB0121) e (SB0295) (Quadro 1).

Analisando a frequência dos espoligotipos entre as propriedades neste estudo, observamos que os isolados 10 e 26 são provenientes da mesma propriedade, casos relatados em anos diferentes, respectivamente 2012 e 2015, e que possuem o espoligotipo SB0121. Os isolados 29 e 34, oriundos da mesma propriedade obtidos nos anos 2015 e 2017, respectivamente possuem o mesmo espoligotipo SB0295 (Quadro 1).

Os isolados 15 e 37 são provenientes de mesma propriedade, os dois casos foram registrados em anos seguidos, 2016 e 2017 e apresentam espoligotipos distintos. Animal 15 (SB0121) e o animal 37 (SB0852). Os dois isolados provenientes dos búfalos 39 e 40, pertencem a mesma propriedade e mesmo ano, identificados como SB0295 (Quadro 1).

Quadro 1. Caracterização molecular dos isolados de *M. bovis* de bovinos no estado de Pernambuco por *Spoligotyping* e MIRU-VNTR.

ID	Octal Spoligotype	Cluster Espoligotipo	Perfil de 24 MIRU-VNTR	Cluster MIRU VNTR	SIT*	Mbovis.org**	Município
1	67677367777600	Cluster S1	2*63***313*3434253332*12	Perfil único	481	SB0121	Bom Conselho
5	67677367777600	S1	226322332324414253332622	Perfil único	481	SB0121	Garanhuns
6	67677367777600	S1	226322332354434253332622	Perfil único	481	SB0121	Chã Grande
7	67677367777600	S1	22*322432364434253332632	Perfil único	481	SB0121	Alagoinha
9	67677367777600	S1	*2*322332363444253332312	Perfil único	481	SB0121	Pedra
10	67677367777600	S1	2*5*****3*34*****3*2***	Perfil único	481	SB0121	Pesqueira /P1
15	67677367777600	S1	**5322*32353434253332*12	Perfil único	481	SB0121	Bom Conselho / BC1
26	67677367777600	S1	225322232353444253332512	Perfil único	481	SB0121	Pesqueira /P1
29	67677367777200	Cluster S2	224322232353444253332112	Perfil único	698	SB0295	Jurema / J1
34	67677367777200	S2	225322232353444251332512	Perfil único	698	SB0295	Jurema / J1
38	67677367777200	S2	2*5322332343444253332612	Perfil único	698	SB0295	Ibirajuba
39	67677367777200	S2	2*4322332343444251332512	Cluster M1	698	SB0295	Ribeirão / R1
40	67677367777200	S2	2*432233234*444251332512	M1	698	SB0295	Ribeirão / R1
35	67677377777200	Cluster S3	225322132323434253333512	Cluster M2	797	SB0852	Bom Conselho
37	67677377777200	S3	2*5322132323434253333512	M2	797	SB0852	Bom Conselho / BC1
12	67677377777600	Perfil único	*1*32231342*434251332512	Perfil único	482	SB0120	Garanhuns
2	Novo perfil	Perfil único	23*322331553414243332612	Perfil único	Novo	Novo	Venturosa

*SIT - [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)

**SB - <http://www.mbovis.org/>

Quadro 2. Perfis genéticos obtidos a partir da análise de 24-loci de MIRU-VNTR

ISOLADOS	MIRU 02 - 154	MTUB 04 - 424	ETR C - 577	MIRU 04 - 580	MIRU 40 - 802	MIRU 10 - 960	MIRU 16 - 1644	MTUB 21 - 1955	MIRU 20 - 2059	QUB 11B - 2163B	ETR A - 2165	MTUB 29 - 2347	MTUB 30 - 2401	ETR B - 2461	MIRU 23 - 2531	MIRU 24 - 2687	MIRU 26 - 2996	MIRU 27 - 3007	MTUB 34 - 3171	MIRU 31 - 3192	MTUB 39 - 3690	QUB 26 - 4052	QUB 4156 - 4156	MIRU 39 - 4348
1	2		6	3				3	1	3		3	4	3	4	2	5	3	3	3	2		1	2
10	2		5							3		3	4						3		2			
15			5	3	2	2		3	2	3	5	3	4	3	4	2	5	3	3	3	2		1	2
9		2		3	2	2	3	3	2	3	6	3	4	4	4	2	5	3	3	3	2	3	1	2
26	2	2	5	3	2	2	2	3	2	3	5	3	4	4	4	2	5	3	3	3	2	5	1	2
5	2	2	6	3	2	2	3	3	2	3	2	4	4	1	4	2	5	3	3	3	2	6	2	2
6	2	2	6	3	2	2	3	3	2	3	5	4	4	3	4	2	5	3	3	3	2	6	2	2
7	2	2		3	2	2	4	3	2	3	6	4	4	3	4	2	5	3	3	3	2	6	3	2
29	2	2	4	3	2	2	2	3	2	3	5	3	4	4	4	2	5	3	3	3	2	1	1	2
38	2		5	3	2	2	3	3	2	3	4	3	4	4	4	2	5	3	3	3	2	6	1	2
34	2	2	5	3	2	2	2	3	2	3	5	3	4	4	4	2	5	1	3	3	2	5	1	2
39	2		4	3	2	2	3	3	2	3	4	3	4	4	4	2	5	1	3	3	2	5	1	2
40	2		4	3	2	2	3	3	2	3	4		4	4	4	2	5	1	3	3	2	5	1	2
35	2	2	5	3	2	2	1	3	2	3	2	3	4	3	4	2	5	3	3	3	3	5	1	2
37	2		5	3	2	2	1	3	2	3	2	3	4	3	4	2	5	3	3	3	3	5	1	2
12		1		3	2	2	3	1	3	4	2		4	3	4	2	5	1	3	3	2	5	1	2
2	2	3		3	2	2	3	3	1	5	5	3	4	1	4	2	4	3	3	3	2	6	1	2

Os padrões de 24-*loci* MIRU-VNTR e o perfil genético de cada isolado, obtido a partir da genotipagem estão exibidos na (Quadro 2). Foram identificados 13 perfis genéticos a partir dos 17 isolados de *M. bovis*, provenientes de 14 propriedades do estado de Pernambuco. A distribuição dos isolados de acordo com a quantidade de alelos em cada locus e a análise da diversidade alélica dos 24 *loci* está sumarizada na (Quadro 3).

Os isolados 1 e 10 apresentaram falhas na amplificação de alguns *loci* que geralmente são atribuídas a possíveis mutações ou degradação do DNA (SUPPLY *et al.*, 2006), impedindo assim, o anelamento dos *primers*. Diante desse resultados, os respectivos isolados passaram a ser analisados apenas no *Spoligotyping* obtendo resultados expressivos.

Um *locus* (ETR A) revelou poder discriminatório mais alto ($h = 0.69$), cinco *loci* foram classificados como moderadamente discriminatório (ETR B, MIRU 16, ETR C, MIRU 27 e QUB 26, com h entre 0.33 a 0.58) oito *loci* mostraram baixo poder discriminatório (MIRU 20, MIRU 26, Mtub 04, Mtub 29, QUB 11b, QUB 4156, Mtub 21, Mtub 39) com $h \leq 0.27$ e dez *loci* não expressaram diversidade alélica.

A análise do poder discriminatório (HGDI) do MIRU-VNTR neste estudo foi maior que o *Spoligotyping*, respectivamente (0.980) e (0.713) (Quadro 4).

Quadro 3. Distribuição e diversidade alélica (HGDI) dos 24 *loci* MIRU-VNTR

Número de repetições							
<i>Locus</i>	1	2	3	4	5	6	Diversidade alélica
MIRU 02		14					0.000
Mtub 04	1	8	1				0.266
ETR C				3	7	3	0.570
MIRU 04			16				0.000
MIRU 40		15					0.000
MIRU 10		15					0.000
MIRU 16	2	3	8	1			0.571
Mtub 21	1		15				0.058
MIRU 20	2	13	1				0.275
QUB 11b			15	1	1		0.165
ETR A		4		3	6	2	0.690
Mtub 29			12	3			0.271
Mtub 30				17			0.000
ETR B	2		7	7			0.575
MIRU 23				16			0.000
MIRU 24		16					0.000
MIRU 26				1	15		0.058
MIRU 27	4		12				0.333
Mtub 34			17				0.000
MIRU 31			16				0.000
Mtub 39		15	2				0.158
QUB 26	1		1		7	5	0.582
QUB 4156	13	2	1				0.275
MIRU 39		16					0.000

Quadro 4. Comparação do poder discriminatório de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR

	<i>Spoligotyping</i>	24 <i>loci</i> MIRU-VNTR
Total de perfis	05	13
Perfis únicos	02	11
Número de isolados por clusters	2 – 8	2
Número de isolados por grupos	15	4
Poder discriminatório (HGDI)	0.713	0.980

6 DISCUSSÃO

Bovinos e bubalinos leiteiros são considerados mais vulneráveis à infecção por *M. bovis* (BROUGHAM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.* 2016), pois possuem expectativa de vida mais longa, permanecendo mais tempo nas propriedades e são submetidos ao sistema de criação semi-intensivo a intensivo, muito comum na região do estudo. Durante a ordenha e outras práticas comuns de manejo ocorre a coabitação de animais, aumentando a probabilidade de contato entre os mesmos e a transmissão da tuberculose (HUMBLET *et al.*, 2010; ALVAREZ *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2016), considerada endêmica no Estado de Pernambuco (IZAEL *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2016). O constante trânsito de animais entre as propriedades e municípios vizinhos, o comércio interestadual de bovídeos, a ausência de controle sanitário efetivo do rebanho, são fatores que contribuem para a disseminação da doença na região (SKUCE *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2016). Ressalta-se que o estado de Pernambuco ocupa lugar de destaque na produção de leite da região Nordeste e o município de Garanhuns e sua microrregião, é reconhecida como a bacia leiteira do Estado (PENAFORTE JÚNIOR *et al.*, 2009).

Nas propriedades leiteiras, geralmente as fêmeas permanecem por mais tempo nos rebanhos em função do período reprodutivo, conforme observado neste estudo o predomínio de fêmeas com idade superior a cinco anos, ou seja, animais mais velhos são mais propensos à exposição ao *M. bovis*, quando comparados aos bovinos jovens (SKUCE *et al.*, 2012; BROUGHAM *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2016). Muito embora, animais jovens possam contrair a infecção, conforme o isolado de *M. bovis* de um bezerro de sete meses de idade, com comprometimento do sistema nervoso central. A frequência da tuberculose em bovinos com idade inferior a 12 meses está geralmente associada a ingestão do colostro/leite de vacas infectadas ou infecção transplacentária (DEL FAVA *et al.*, 2010; KONRADT *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2018).

Neste estudo todos os animais apresentaram sintomatologia clínica da tuberculose, sendo o comprometimento respiratório predominante nos animais. Os sinais clínicos mais evidentes foram observados nos estágios mais avançados da doença, conforme descrito por IZAEL *et al.* (2009) e WATERS (2015), a exceção do bovino jovem com tuberculose cerebral que manifestou mais precocemente a doença, salientando que o animal apresentava como sinal neurológico, depressão e paresia dos membros. Este resultado difere dos achados relatados por Del Fava *et al.* (2010), Konradt *et al.* (2016) e Silveira *et al.* (2018) que

identificaram tuberculose cerebral em bovinos a partir de seis meses de idade apresentando sinais neurológicos. Além do comprometimento respiratório predominante nos animais deste estudo, dois bovinos apresentaram alterações clínicas em glândula mamária (NASSAR *et al.*, 2005; WATERS, 2015), o que reforça o potencial risco da enfermidade para a saúde pública devido ao consumo do leite cru e derivados não pasteurizados, particularmente observados em cidades interioranas e áreas rurais, como Garanhuns e microrregião (PENAFORTE JÚNIOR *et al.*, 2009).

A forma generalizada da doença foi predominante entre os animais (bovinos e bubalinos) neste estudo, com lesões distribuídas em vários órgãos. Todos os animais envolvidos apresentavam lesões granulomatosas nos órgãos torácicos (pulmões, pleura, linfonodos traqueobrônquicos e mediastínicos), acarretando o comprometimento respiratório. Este resultado é semelhante aos descritos por Ramos *et al.* (2018) que reportou maior prevalência de lesões compatíveis com tuberculose em linfonodos traqueobrônquicos, mediastínicos e pulmões, enquanto Alzamora Filho *et al.* (2014) identificou as lesões mais evidentes nos linfonodos da cabeça (retrofaringeo e parotídeo) e parênquima pulmonar. Esses resultados corroboram com os achados do presente estudo, em função do predomínio em comum das lesões no trato respiratório, sugerindo a via respiratória, como principal porta de entrada do *M. bovis* nos bovídeos.

A menor ocorrência de comprometimento dos linfonodos mesentéricos, também descrito por Ramos *et al.* (2018) pode ser justificado pelo fato de que nos bovinos adultos, a via oral da infecção é secundária a via respiratória (TAYLOR *et al.*, 2007).

As lesões granulomatosas observadas em glândula mamária e útero comuns a dois animais neste estudo, reforçam o potencial risco de transmissão do *M. bovis* aos humanos em função do consumo de leite cru e seus subprodutos (CEZAR *et al.* 2016b; SIALA *et al.*, 2019), assim como sugerem a possibilidade de transmissão transplacentária de tuberculose, considerada forma muito rara de transmissão (NASSAR *et al.*, 2005, WATERS, 2015).

As lesões granulomatosas localizadas no sistema nervoso central no bovino jovem provavelmente relacionada a ingestão de colostro/leite de vacas infectadas, podem ser justificadas pela infecção ascendente via hematogênica. Essa forma de tuberculose cerebral em bovinos foi também relatada por Del Fava *et al.* (2010); Konradt *et al.* (2016) e Silveira *et al.* (2018).

A forma generalizada da doença também foi observada nos búfalos, caracterizada por nódulos firmes e esbranquiçados, coloração comum também observada por Pereira *et al.*

(2017), diferindo em relação a localização das lesões, que não foram observadas lesões mesentéricas, enquanto Albernaz *et al.* (2015) registrou granulomas em linfonodos mediastínicos e mesentéricos.

A caracterização histopatológica das lesões presentes nos granulomas foram semelhantes aos achados descritos por França *et al.* (2013) e Andreazza *et al.* (2015), que verificaram em algumas amostras acentuado processo de calcificação com mineralização, diferindo das lesões observadas por Ramos *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2018a) que apresentaram aspecto mais caseoso sugerindo que os animais foram abatidos durante o curso recente da infecção.

O percentual de 57% de isolamento de *M. bovis* de casos clínicos de tuberculose revelou resultado semelhante ao descrito por Silva *et al.* (2018a) que obtiveram 56% de isolamento a partir de lesões sugestivas de tuberculose oriundas de bovinos de abatedouros. No entanto, Franco *et al.* (2017) alcançaram 67% de isolamento bacteriano de linfonodos, ao passo que Ramos *et al.* (2018) relataram resultados inferiores de sucesso no cultivo com 41,9% de isolamento de bovinos positivos à tuberculinização. Contudo, sabe-se que alguns fatores podem interferir no sucesso do isolamento micobacteriano, particularmente *M. bovis*, como o rigoroso processo de descontaminação pelo qual as amostras são submetidas, o caráter crônico da doença que confere intensa calcificação das lesões, levando a baixa concentração ou ausência de bacilos viáveis (AMBROSIO *et al.*, 2008; FRÁGUAS *et al.*, 2008), o que provavelmente resultou no percentual de isolamento de 57% observado neste estudo, no qual foram processadas amostras de casos clínico de tuberculose.

Em relação ao crescimento bacteriano de outros agentes, que não *Mycobacterium* sp, como *Trueperella pyogenes* e *Nocardia* spp, vale ressaltar que alguns microrganismos além destes como *Actinomyces* spp e *Actinobacillus* spp, também são responsáveis por acarretar lesões granulomatosas semelhantes às lesões provocadas pela tuberculose (CURCIO *et al.*, 2002; BIFFA *et al.*, 2010; PARREIRAS *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2013).

➤ **Diagnóstico molecular**

No presente estudo 17 isolados compatíveis com *Mycobacterium* sp foram submetidos ao diagnóstico molecular pela análise do polimorfismo nos fragmentos de restrição (RFLP) do gene *gyrB*. No entanto, a análise classificou apenas 14 (17) isolados como *M. bovis*, diferente do estudo realizado por Franco *et al.* (2017) que obteve 100% de

compatibilidade entre o isolamento de *Mycobacterium* spp e o *gyrB*-RFLP. O resultado obtido na RFLP provavelmente está relacionado a fatores que interferem nas provas moleculares, como a presença de inibidores das reações de PCR, baixa quantidade de bacilos viáveis devido a cronicidade das lesões, contaminantes nas amostras, falhas no processamento de extração ou degradação do DNA, que interrompem o anelamento dos *primers*, gerando resultados falso negativos (AYELE *et al.*, 2004; CAREL *et al.*, 2014). Em razão das limitações apresentadas pelo diagnóstico molecular e dada a importância do isolamento bacteriano como prova padrão ouro (DREWE; SMITH, 2014), as 17 amostras identificadas no isolamento bacteriano foram submetidas as técnicas de genotipagem pelo *Spoligotyping* e 24 *loci* MIRU-VNTR.

➤ Genotipagem molecular

A genotipagem pelo *Spoligotyping* classificou os 17 isolados como *M. bovis*, caracterizando-os em cinco diferentes perfis, entre os quais SB0295, SB0120, SB0852, um novo perfil ainda não registrado e o espoligotipo SB0121, predominante neste estudo.

A distribuição do SB0121 foi descrita no território nacional como o espoligotipo mais prevalente com 29,1% dentre os registrados no Brasil em estudo realizado nos países da América Latina (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013). Na região Centro Oeste do país foi o espoligotipo predominante com 37,8% dos isolados (CARVALHO *et al.*, 2016). Já na região Sul, correspondeu a 93% dos espoligotipos identificados entre os isolados de *M. bovis*, formando um *cluster* de 79 isolados (RAMOS *et al.*, 2014) e no estado da Bahia, foi o mais prevalente dentre 8 perfis registrados (ALZAMORA FILHO *et al.*, 2014).

O espoligotipo SB0121 foi predominante neste estudo com 8 (17) isolados, sendo identificado nas três regiões geográficas definidas do estado de Pernambuco. Portanto, o mesmo perfil registrado em diferentes localidades, pode ser justificado pela constante movimentação dos animais, em função da prática de comércio de gado interestadual, permitindo que animais de distintas localidades sejam infectados com a mesma cepa de *M. bovis*, ou seja, o mesmo perfil distribuído em várias regiões, podem sugerir infecções recentes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013).

No estado de São Paulo, foi o segundo espoligotipo mais prevalente descrito por Franco *et al.* (2017) com 25,3% do total de isolados e por Rocha *et al.* (2012) com 32,76%. Parreiras *et al.* (2012) também identificou o SB0121 dentre os isolados distribuídos em

várias regiões de estudo com 23% do total de isolados. Esses resultados expressam a ampla distribuição da cepa SB0121 no território nacional e que pode estar relacionada ao processo evolutivo das regiões DR (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2011).

Neste estudo apenas um (1) isolado de *M. bovis* foi classificado como SB0120, semelhante a baixa frequência de ocorrência relatada em outras regiões do país. No estado de São Paulo, foi registrado em apenas um (1) isolado por Franco *et al.* (2017), no Rio de Janeiro também em apenas um isolado (FIGUEIREDO *et al.* 2012) e em três isolados por Parreiras *et al.* (2012). Zumárraga *et al.* (2013), identificou o espoligotipo SB0120 em 6,3% dos isolados registrados em todo o território nacional.

Os resultados referentes a cepa SB0120, corroboram com a hipótese que a cepa conhecida como *BCG-like* seria considerada a cepa ancestral do espoligotipo SB0120, perfil definido pelo banco de dados internacional (www.mbovis.org) pela ausência dos espaçadores 3, 9, 16, 39-43. E por sua vez, o tipo *BCG-like derived* seria um perfil que evoluiu pela ausência de um ou mais espaçadores, como o SB0121 que possui ausência dos espaçadores 3, 9, 16, 21, 39-43, configurando um processo evolutivo das regiões DR (HADDAD *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2011).

Os espoligotipos identificados neste estudo foram isolados de bovídeos leiteiros provenientes de três regiões geográficas do estado de Pernambuco. A região do agreste meridional apresentou maior diversidade de perfis. Essa variedade pode ser atribuída a característica da região, com predomínio de rebanhos tipicamente leiteiros (PENAFORTE JÚNIOR *et al.*, 2009), dada essa condição, a comercialização e movimentação do gado entre propriedades, municípios e estados facilita a disseminação dos genótipos entre as regiões, tornando condição favorável para a disseminação de genótipos distintos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

O perfil SB0295 foi o segundo espoligotipo mais prevalente neste estudo. No Brasil é referenciado com prevalência de 24% do total de isolados (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013). Esses resultados são semelhantes aos verificados na região Centro Oeste do país, sendo identificado em 16,2% do total de isolados (CARVALHO *et al.*, 2016). Na região de São Paulo, o espoligotipo SB0295 foi o mais prevalente reportado por Rocha *et al.* (2012) e por Franco *et al.* (2017) com 35,3% e 26,8% do total de isolados, respectivamente. No estado da Bahia foi identificado em apenas dois isolados (14%) por Alzamora Filho *et al.* (2014). Os espoligotipos SB0121 e SB0295 diferem pela ausência de um único espaçador (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Os isolados de búfalos neste estudo apresentaram o espoligotipo SB0295, perfil comum aos identificados nos búfalos na região Amazônica, descrito por Carneiro *et al.* (2019). Na região é comum a criação mista de búfalos e bovinos sob as mesmas condições de manejo. O SB0295 também foi registrado em búfalos na Argentina, descrito por Zumárraga *et al.* (2013).

A região geográfica do agreste central e da mata sul compartilharam das mesmas cepas SB0121 e SB0295, distribuídas entre regiões próximas. Esta condição também foi relatada por Carvalho *et al.* (2016) trabalhando na região Centro Oeste do país, sugerindo um processo de seleção natural dessas linhagens entre localizações geográficas. Salienta-se que as duas regiões citadas apresentam menor quantitativo de propriedades leiteiras, quando comparadas à região do agreste meridional, considerada a bacia leiteira do estado de Pernambuco, desta forma ocorre menor exposição à variedades de cepas provenientes do comércio e movimentação do gado (SMITH *et al.*, 2003; SOUZA FILHO *et al.*, 2013).

O espoligotipo SB0852 foi identificado em apenas dois isolados provenientes do município de Bom Conselho, que também tem registrado o espoligotipo SB0121. De acordo com a base de dados internacional, o perfil SB0852 só foi registrado na Itália, em apenas dois isolados de bovinos, descritos por Boniotti *et al.* (2009), sugerindo um processo de seleção natural dessas linhagens entre localizações geográficas (CARVALHO *et al.*, 2016) ou o processo evolutivo das espécies devido as eliminações de espaçadores DR, possibilitando a origem de novas linhas genéticas, e assim surgindo os espoligotipos semelhantes aos observados em outras regiões sem relação epidemiológica (homoplasias) (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013).

Entre os padrões identificados neste estudo, um dos isolados de *M. bovis* de um bovino procedente do município de Venturosa, no agreste meridional, não apresentou perfil compatível disponível no banco de dados internacional www.mbovis.org e www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE sendo então caracterizado como uma nova cepa de *M. bovis*. Essa particularidade de perfis sem registro (SB ou SIT) no banco de dados internacionais de espoligotipos provavelmente refletem eventos micro evolutivos nas regiões DR de uma cepa existente (BRUDEY *et al.*, 2006; ADESOKAN *et al.*, 2019).

Na região de desenvolvimento do estudo, a tuberculose bovina é caracterizada como endêmica e a prática da comercialização e consumo do leite e derivados *in natura* potencializam o risco de transmissão zoonótica, aumentando o risco de compartilhamento de isolados de *M. bovis* comuns entre os bovídeos leiteiros e a população humana da região,

conforme registrado previamente em outros estudos em distintas regiões do mundo (DE LA RUA DOMENECH *et al.*, 2016; LARI *et al.*, 2011; ADESOKAN *et al.*, 2019).

O compartilhamento de isolados comuns a humanos e animais, como os espoligotipos SB0121 e SB0120, já comprovados nos países em desenvolvimento, representa um dos principais fatores de risco em comum, relacionados ao consumo de leite cru, potencializando o papel zoonótico do *M. bovis* como agente causador da tuberculose humana (MALAMA *et al.*, 2014), tornando a comparação de perfis moleculares específicos de cepas entre isolados de humanos e animais de extrema importância, que podem fornecer informações relacionadas as fontes de infecção e vias de transmissão ao homem, auxiliando na elaboração de estratégias de controle e combate a enfermidade (SIALA *et al.*, 2019).

A diversidade de cepas de *M. bovis* nos países em desenvolvimento, particularmente na África não parece ser em função da importação recente de animais, mas provavelmente em função da reinfecção constante dos animais reservatórios, ou seja, a infecção é mantida em cada região (MACHADO *et al.*, 2018).

A diversidade genômica no complexo *M. tuberculosis* continua sendo um fator significativo na patogênese da tuberculose, que pode afetar a virulência, transmissibilidade, resposta ao hospedeiro e poder de resistência aos medicamentos (ADESOKAN *et al.*, 2019).

➤ **MIRU-VNTR**

A genotipagem realizada neste estudo a partir do conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR é recomendada para o estudo comparativo dos perfis de *M. bovis* em todo mundo, demonstrando eficiência na discriminação de isolados, sendo considerada a prova padrão ouro na genotipagem das espécies do complexo *M. tuberculosis*, com resultados altamente reprodutíveis quando comparados ao conjunto de 12 *loci* MIRU-VNTR (SUPPLY *et al.*, 2006; GHAVIDEL *et al.*, 2018).

A genotipagem molecular identificou 13 perfis genéticos distintos, sugerindo alta diversidade de *M. bovis* entre as regiões estudadas, e por sua vez revelou resultado superior comparado ao número de perfis identificados pelo *Spoligotyping*. Resultado semelhante relacionado a maior diversidade de perfis comparado ao *Spoligotyping* foi encontrado por Carvalho *et al.* (2016) conferindo maior poder discriminatório do MIRU-VNTR para a genotipagem das cepas de *M. bovis* da região em estudo. Esses resultados inferem que a heterogeneidade dos perfis genéticos encontrados confirmam a alta diversidade genética

entre as linhagens de *M. bovis* circulantes na região, geralmente justificada devido a movimentação dos animais entre diferentes regiões, estados e propriedades rurais (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2016).

Os isolados 1 e 10, apresentaram falhas na amplificação de alguns *loci*. Essas falhas podem ser atribuídas a possíveis mutações ou degradação do DNA, impedindo assim, o anelamento dos *primers*. No entanto, os genótipos podem ser comparados de forma confiável com base na caracterização de outros *loci* (SUPPLY *et al.*, 2006).

A análise da diversidade alélica (h) realizada dos *loci* individualmente revelou que o *loci* ETR A apresentou alta diversidade alélica ($h > 0.6$). A diversidade alélica dos *loci* QUB26, ETR B, ETR C, MIRU 16 e MIRU 27 revelaram moderado poder discriminatório $0,3 \leq h \leq 0,6$. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Souza Filho *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2016) que também utilizaram painel de 24 *loci* para caracterização genotípica dos isolados de *M. bovis*.

Para os isolados de *M. bovis* da região, foi observado que dos 24 *loci* MIRU-VNTR utilizados, apenas seis permitiram boa discriminação. Resultado semelhante também foi descrito comparado aos *loci* que não apresentaram polimorfismo ou com baixa diversidade nos trabalhos realizados por Souza Filho *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2016), no entanto, esses resultados ratificam a hipótese que ocorra menor polimorfismo no genoma do *M. bovis* quando comparados ao *M. tuberculosis*, permitindo que alguns *loci* apresentem individualmente elevado poder discriminatório tanto para isolados de *M. bovis* quanto para *M. tuberculosis* (RORING *et al.*, 2004; HILTY *et al.*, 2005).

A análise do poder discriminatório (HGDI) do MIRU-VNTR neste estudo foi maior que o *Spoligotyping*, respectivamente (0.980) e (0.713). O estudo realizado por Carvalho *et al.* (2016) revelou valores de MIRU-VNTR e *Spoligotyping* de (0.980) e (0.810) respectivamente. Souza Filho *et al.* (2013) realizou a técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* obtendo valor de (0.912). Geralmente a genotipagem pelo MIRU-VNTR revela valores de HGDI mais elevados quando comparados ao método de *Spoligotyping*, comprovando eficiência na técnica, inferindo confiabilidade e resultados reprodutíveis (HUNTER; GASTON, 1988).

A caracterização genotípica dos isolados de *M. bovis* de pacientes humanos com tuberculose extrapulmonar, identificou maior diversidade de perfis genéticos pelo MIRU-VNTR comparado ao *Spoligotyping*, ressaltando a utilização de um conjunto de 8 *loci*, que revelaram elevada diversidade alélica em 6 dos 8 *loci* analisados e o poder discriminatório

HGDI obtido foi de 0.977 (SIALA *et al.*, 2019). A análise desses resultados apoiam a condição que possa ocorrer menor polimorfismo no genoma do *M. bovis* quando comparados ao *M. tuberculosis*, conferindo aos *loci* individualmente elevado poder discriminatório, neste caso para os isolados de *M. tuberculosis* (RORING *et al.*, 2004; HILTY *et al.*, 2005).

O estudo genotípico realizado pelo MIRU-VNTR apresenta maior poder discriminatório comparado ao *Spoligotyping*, no entanto, a associação entre estas técnicas, tem sido considerada a melhor estratégia para a tipagem molecular de *M. bovis* por apresentarem melhor reprodutibilidade e confiabilidade visando a análise das linhagens micobacterianas (CARVALHO *et al.*, 2016; GHAVIDEL *et al.*, 2018).

Este estudo apresenta grande importância para a região por ser o primeiro trabalho realizado sobre genotipagem molecular por meio da associação entre o *Spoligotyping* e MIRU-VNTR objetivando a caracterização molecular de isolados de *M. bovis* e identificação dos genótipos circulantes no estado de Pernambuco. Vale ressaltar a importância do *M. bovis* como causa da tuberculose humana, ainda que algumas vezes negligenciada, principalmente nos países em desenvolvimento. O consumo de leite cru e derivados, e a constante exposição aos animais reservatórios são considerados os principais fatores de risco na cadeia epidemiológica da infecção.

7 CONCLUSÃO

A caracterização genotípica permitiu a identificação de diferentes genótipos de *M. bovis* circulantes no estado de Pernambuco, sendo esta ferramenta determinante na melhor compreensão epidemiológica e elaboração de estratégias de controle e combate a enfermidade.

O consumo do leite e derivados *in natura* ainda é um hábito frequente na região, onde a tuberculose bovina é endêmica, potencializando o risco de transmissão zoonótica, motivando a chamar a atenção das autoridades sanitárias para a possibilidade de compartilhamento de isolados de *M. bovis* comuns entre os bovídeos leiteiros e a população da região.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais.** 1998. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ADESOKAN, H. K. *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from livestock workers and cattle in Nigeria. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. 1-13, 2019.
- ALBERNAZ, T. T. *et al.* Comparison of the tuberculin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in buffaloes (*Bubbalus bubalis*) in Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 47, n. 6, p. 1153-1159, 2015.
- ALEXANDER, K. A. *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infection Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296-1299, 2010.
- ALLIX-BEGUEC, C. *et al.* Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR_{plus}, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2692-2699, 2008.
- ALVAREZ, J. *et al.* Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 years period. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 100, p. 2-8, 2012.
- ALZAMORA FILHO, F. *et al.* Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 103-108, 2014.
- AMADIO, A. *et al.* Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2481-2484, 2005.
- AMBROSIO, S. R. *et al.* Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.
- ANDREAZZA, D. *et al.* Caracterização histológica e imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 129-136, 2015.
- ANDRIEVSKAIA, O. *et al.* Genotypes of *Mycobacterium bovis* strains isolated from domestic animals and wildlife in Canada in 1985-2015. **Veterinary Microbiology**, v. 214, p. 44-50, 2018.

ARANAZ, A. *et al.* Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2734-2740, 1996.

AYELE, W. Y. *et al.* Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 924-937, 2004.

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

BALIAN, S. C. *et al.* Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 11-14, 2002.

BEER, J. L. *et al.* First world proficiency study on Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 662-669, 2012.

BEZERRA, A. V. A. *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes by Real-Time PCR in bovine milk from Brazilian Dairy Farms. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 5, p. 1037-1042, 2015.

BIFFA, D.; BOGALE, A.; SKJERVE, E. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. **BMC Public Health**, v. 10, n. 462, p. 2-12, 2010.

BONIOTTI, M. B. *et al.* Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of Variable Number Tandem Repeats for geographically optimized genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 636-644, 2009.

BRASIL. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Secretaria de defesa animal. 2006. 188 p.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 19, de 10 de outubro de 2016. Art. 1º Fica estabelecido o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT e a Classificação das Unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças brucelose e tuberculose, assim como a definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com a classificação, na forma desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, n. 211, 03 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 10, de 03 de março de 2017. Art. 1º Fica estabelecido o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT e a Classificação das Unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças

brucelose e tuberculose, assim como a definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com a classificação, na forma desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, n. 116, 20 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**, v. 50, mar. 2019.

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

BROUGHAN, J. M. *et al.* A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. **Epidemiology e Infection**, v. 144, n. 14, p. 2899-2926, 2016.

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

CAREL, C. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. **PLoS One**, v. 9 n. 5, 2014.

CARNEIRO, P. A. M. *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* infection in cattle and buffalo in Amazon Region, Brazil. **Veterinary Medicine and Science**, p. 1-9, sept. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1002/vms3.203>

CARVALHO, R. C. T. *et al.* Use of the PCR for Detection *Mycobacterium bovis* in Milk. *In*: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS – MICROAL, 12., 2014, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Blucher, 2014. v. 1, n. 1, p. 359-360. DOI: 10.5151/foodsci-microal-180

CARVALHO, R. C. T. *et al.* Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* from Cattle Reared in Midwest Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-16, 2016.

CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. *In*: MAXIE, M. G.; JUBB, KENNEDY, PALMER'S. **Pathology of domestic animals**. 5th ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. v. 2. p. 523-332.

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

CEZAR, R. D. S. *et al.* Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 31, p. 1-6, 2016a.

CEZAR, R. D. S. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, p. 269-272, 2016b.

- CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; LEÃO, S.C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 745-748, 2004.
- COLLINS, D. M. 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.
- COUSINS, D. V. *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.
- CURCIO, B. R. *et al.* Isolamento de *Arcanobacterium pyogenes* de granuloma actinomicóide em bovino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 885-889, 2002.
- DE LA RUA DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77-109, 2006.
- DEL FAVA, C. *et al.* Granulomatous meningo myeloencephalitis in a calf caused by *Mycobacterium bovis*. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 335-338, 2010.
- DIAS, R. A. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3673-3684, 2016.
- DJEMAL, S. E. *et al.* Genetic diversity assessment of Tunisian *Mycobacterium bovis* population isolated from Cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 393, p. 1-8, 2017.
- DIPPENAAR, A. *et al.* Progenitor strain introduction of *Mycobacterium bovis* at the wildlife-livestock interface can lead to clonal expansion of the disease in a single ecosystem. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 235-238, 2017.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger – Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.
- DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, p. 1-10, 2014.
- DOMINGOS, S. C. B. *et al.* A systematic review on the distribution of *Mycobacterium bovis* infection among wildlife in the Americas. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-5, 2019.
- DREWE, J. A.; SMITH, N. H. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; KANEENE, J. B. **Zoonotic Tuberculosis: Mycobacterium bovis** and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley, 2014, cap.7, p. 79-88.

FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para intervenções. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 1-16, 2009.

FERREIRA NETO, J. S. *et al.* Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3385-3402, 2016.

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

FILLIOL, I. *et al.* Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 1347-1349, 2002.

FITZGERALD, S. D.; KANEENE, J. B. Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: hosts, pathology, surveillance, and control. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 3, p. 488-499, 2012.

FRÁGUAS, S. A. *et al.* Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.

FRANÇA, L. R. *et al.* Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 14, n. 4, p. 721-733, 2013.

FRANCO, M. M. J. *et al.* Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 85, p. 2-8, 2013.

FRANCO, M. M. J. *et al.* Genotyping and rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated from the lymph nodes of slaughtered cattle. **Tuberculosis**, n. 104, p. 30-37, 2017.

FURLANETTO, L. V. *et al.* Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1138-1144, 2012.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.

GARNIER, T. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

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

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

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 137-151. 1994.

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

HEINEMANN, M. B. *et al.* Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. **Caderno Técnico Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1-12. 2008.

HILTY, M. *et al.* Evaluation of the discriminatory power of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 217-222, 2005.

HUARD, R. C. *et al.* A PCR – Based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

HUMBLET, M. F. *et al.* New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2802-2808, 2010.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465–66, 1988.

INGEN, J. V. *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infection Diseases**, v. 18, n. 4, p. 653-655, 2012.

IZAEL, M. A. *et al.* Estudo retrospectivo da ocorrência dos casos de Tuberculose Bovina diagnosticados na Clínica de Bovinos de Garanhuns, PE de 2000 a 2009. **Ciência Animal Brasileira**, Belo Horizonte, p. 452-457, 2009. Supl 1. Trabalho apresentado no 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 907-914, 1997.

KANEENE, J. B. *et al.* One Health approach for preventing and controlling tuberculosis in animals and humans. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; KANEENE, J. B. **Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria**. 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley, 2014. cap. 2, p. 9-20.

KANTOR, I. N. *et al.* Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis**, v. 88, n. 4, p. 358-365, 2008.

- KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 301-308, 2000.
- KEATING, L. A. *et al.* The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 163-174, 2005.
- KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D.F. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2014.
- KONRADT, G. *et al.* Neurotuberculosis in cattle in southern Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 48, p. 1089-1094, 2016.
- KORO KORO, F. *et al.* The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. **Review of the Office International des Epizooties**, v. 34, n. 3, p. 1001-1010, 2015.
- LARI, N. *et al.* Genetic diversity of human isolates of *Mycobacterium bovis* assessed by Spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat genotyping. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 175-180, 2011.
- LE FLÈCHE. *et al.* A tandem repeats database for bacterial genomes: applications to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BCM Microbiology**, v. 1, n. 2, 2001.
- LIMA, P. R. B. *et al.* Situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3601-3610, 2016.
- LUNA S. P. L.; TEIXEIRA M. W. Eutanásia: considerações éticas e indicações técnicas. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília - DF, n. 41, p. 60-69, 2007.
- MACHADO, A. *et al.* Genetic diversity and potential routes of transmission of *Mycobacterium bovis* in Mozambique. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2018.
- MACIEL, A. L. G. *et al.* Tuberculosis in Southern Brazilian wild boars (*Sus scrofa*): First epidemiological findings. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1-9, 2017.
- MALAMA, S.; MUMA, J. B.; GODFROID, J. A review of tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in Zambia. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 2, n. 13, p. 1-5, 2013.
- MALAMA, S. *et al.* Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. **Veterinary Medicine International**, p. 1-8, 2014.
- MAYER, F. Q. *et al.* *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu tajacu*): Insights on tuberculosis wild reservoirs. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 549-551, 2012.

MAZARS, E. *et al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MENDES, R. E. *et al.* Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) por suspeita de tuberculose. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 448-453, 2013.

MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal - human interface: A problem, or not? **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 371-381, 2010.

MILLER, M. A. *et al.* *Mycobacterium bovis* in a Free-Ranging Black Rhinoceros, Kruger National Park, South Africa, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 557-558, 2017.

MONAGHAN, M. *et al.* The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 111-124, 1994.

MORAES, B. M. N; BENDER FILHO, R. Mercado Brasileiro de Lácteos: análise do impacto de políticas de estímulo à produção. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 4, p. 783-800, 2017.

MÜLLER, B. *et al.* Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 899-908, 2013.

MURAKAMI, P. S. An outbreak of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in coatis (*Nasua nasua*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 338-341, 2012.

NASSAR, A. F. C; ROXO, E; PORTUGAL, M. A. S. C. Revisão: tuberculose genital em bovinos e bubalinos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 135-144, 2005.

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

NÉSPOLI, J. M. B. *et al.* Epidemiologic situation of bovine tuberculosis in the State of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3589-3600, 2016.

NUGENT, G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-411 host complexes: a New Zealand case study. **Veterinary Microbiology**. v. 151, p. 34-42, 2011.

OLEA-POPELKA, F. *et al.* Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* a call for action. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 21-25, 2017.

ORUÇ, E. Meningoencephalitis tuberculosa in a holstein cow. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 856-858, 2005.

PARREIRAS, P. M. *et al.* Spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 64-73, 2012.

PEDROSO, E. R. P.; ROCHA, M. O. C. Infecções emergentes e reemergentes. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 19, n. 2, p. 140-150, 2009.

PENAFORTE JÚNIOR. *et al.* Perfil dos produtores de leite do município de Garanhuns. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9, 2009, Recife. **Anais eletrônicos**. Recife: UFRPE, 2009. p. 1-3. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1002-2.pdf>. Acesso em: 02 set. 2019.

PEREIRA, J. D. B. *et al.* Diagnóstico histopatológico e molecular de lesões sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos nos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1198-1204, 2017.

PORPHYRE, T.; STEVENSON, M. A.; MCKENZIE, J. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 86, p. 93-106, 2008.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 4, p. 357-399, 1988.

RAMOS, D. F. *et al.* Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 365-372, 2014.

RAMOS, J. M. *et al.* Isolation and Identification of *Mycobacterium bovis* in bovines with positive reaction to the tuberculin test in the State of Paraíba, northeast Brazil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-7, 2018.

RIBEIRO, L. A. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3561-3566, 2016.

RIOJAS, M. A. *et al.* Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 324-332, 2018.

ROCHA, V. C. M. *et al.* Tuberculosis determined by *Mycobacterium bovis* in captive waterbucks (*Kobus ellipsiprymnus*) in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 726-728, 2011.

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

RODRÍGUEZ, S. *et al.* High spoligotyping diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 89-95, 2010.

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

RORING, S. *et al.* Evaluation of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 65-73, 2004.

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

RUGGIERO, A. P. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

RYAN, T. J. *et al.* Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 211-219, 2006.

SAHRAOUI, N. *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 4, p. 1-7, 2009.

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

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

SIALA, M. *et al.* First-time detection and identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex members in extrapulmonary tuberculosis clinical samples in South Tunisia by a single tube tetraplex real-time PCR assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1-13, 2017.

SIALA, M. *et al.* A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolated from extrapulmonary tuberculosis patients in South Tunisia assessed by Spoligotyping and MIRU-VNTR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1-19, 2019.

SILVA, W. E. L. *et al.* Molecular identification of *Mycobacterium* spp in goat milk samples. *In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PATHOGENS AT THE HUMAN – ANIMAL INTERFACE (ICOPHAI)*, ICOPHAI, 2., 2013. Porto de Galinhas, PE, 2013.

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

SILVA, M. R. *et al.* Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in a urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 8, p. 1-6, 2018.

SILVA, D. A. V. *et al.* Comparison between tests for tuberculosis diagnosis in slaughtered bovines. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-5, 2018.

SILVA, S. C. G. *et al.* Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in cattle slaughtered from an abattoir in Garanhuns, Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 157-166, 2018.

SILVEIRA, A. M. *et al.* Tuberculosis of the central nervous system in cattle in Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 2092-2098, 2018.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, W. J. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**, p. 1-10, 2012.

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

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

SOBRAL, L. F. *et al.* Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas de espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 5, p. 664-668, 2011.

SOBREIRA FILHO, R. D. **Prevalência e fatores associados à infecção pelo *Mycobacterium bovis* em bovinos leiteiros no Município de Gravatá, PE.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2008.

SOLA, C. *et al.* Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's association with VNTR and Spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 125-133. 2003.

SOUZA-FILHO, A. F. **Genotipagem pela técnica MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* isolados de tecido bovino.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2013.

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

SUPPLY, P. *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

- SUPPLY, P. *et al.* Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.
- SWEETLINE ANNE, N. *et al.* Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 198, p. 81-87, 2017.
- SWEETLINE ANNE, N. *et al.* Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. **Tuberculosis**, v. 114, p. 113-118, 2019.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 4, p. 832-837, 1994.
- TAYLOR, G. M. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **Veterinary Research**, v. 3, n. 12, p. 1-11, 2007.
- THOEN, C. O.; BARLETTA, R. Pathogenes is of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, J.H. (Eds). ***Mycobacterium bovis Infectious in Animals and Humans***, 2nd. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 2005, 331p.
- THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A. Tuberculosis in animals and humans, an introduction, cap.1, p. 3-7. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; KANEENE, J. B. **Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria**. 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley, 2014, 413p.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, 9 ed. Ed Roca, São Paulo, 2014, 531p.
- VAN BELKUM, A. *et al.* Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p. 275-293, 1998.
- VASCONCELLOS, S. E. *et al.* Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-14, 2014.
- VELOSO, F. P. *et al.* Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3659-3672, 2016.
- ZARDEN, C. F. O. *et al.* A complementary diagnosis of naturally occurring tuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Rio de Janeiro using a MPB70-ELISA, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 5, p. 1203-1206, 2013.
- ZUMÁRRAGA, M. J. *et al.* Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 9-21, 2013.

WANGOO, A. *et al.* Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis* - infected cattle are associated with increased expression. of type I procollagen, gd (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 223-234, 2005.

WATERS, W. R. Diseases of the Respiratory System. *In*: SMITH, B.P. **Large Animal Internal Medicine**. 5rd ed. Elsevier, 2015. chapter 31, p. 633-638.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2018**. Geneva: 2018