

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Diversidade Genética de Isolados de *Mycobacterium bovis*
da Região Amazônica, Brasil.**

Autora: Taynara Nunes Pasquatti
Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
Co-orientador (a): Prof^a Dra. Daniele Bier Borges

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Janeiro – 2019

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Diversidade Genética de Isolados de *Mycobacterium bovis*
da Região Amazônica, Brasil.**

Autora: Taynara Nunes Pasquatti
Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
Co-orientador (a): Profª Dra. Daniele Bier Borges

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Janeiro – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Católica Dom Bosco
Bibliotecária Mourãmise de Moura Viana - CRB-1 3360

P284d Pasquatti, Taynara Nunes
Diversidade genética de isolados de Mycobacterium
bovis da região Amazônica, Brasil/ Taynara Nunes Pasquatti.--
Campo Grande, MS : 2019.
1 CD-ROM

Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande MS, 2019
Inclui bibliografias

1. Dissertação - Biotecnologia. 2. Diversidade genética
- Bovinos - Amazônia. . I. Título.

CDD: Ed. 21 -- 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Diversidade Genética de Isolados de *Mycobacterium bovis* da Região Amazônica, Brasil

Autora: Taynara Nunes Pasquatti

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Daniele Bier Borges

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 28 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo - UCDB

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB
Prof. Dr. Martín José Zumárraga - INTA
Profa. Dra. Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge - UFMS

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido o dom da vida, saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço a minha amada mãe, Maria Cristina Nunes, por todo esforço, dedicação, amor, carinho, que mesmo diante de todas as dificuldades, nunca deixou que nada me faltasse nada.

Agradeço novamente a Deus por ter me dado um pai de coração, Vicínio Vieira Jardim, que me criou como filha, me dando amor e carinho, mesmo morando longe, está presente todos os dias na minha vida.

Agradeço ao meu namorado Josué José Lourenço Filho e a sua família pelo amor e carinho.

Aos meus tios, Glauber Nunes e Glaucos Nunes, por sempre me apoiarem nos estudos.

As minhas avós, Emília Xavier da Silva e Marly Nunes, por todo amor e carinho.

As minhas paixões de quatro patas: Pingo, Princesa, Pitucha, Batman e Sandy (*in memoriam*), por sempre me darem ânimo e força para esquecer os problemas de fora.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, primeiramente pela paciência e pelos conselhos, confiança, puxadas de orelha e amizade.

À minha co-orientadora, Dra Daniele Bier Borges, pela paciência em ensinar, disponibilidade de tempo para me atender, mesmo com seus horários apertados e por toda amizade.

À todas as meninas do Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, em especial à Gisele Leguizamon e Rudielle Rodrigues, que foram companheiras de todos os dias.

Ao Dr. Martín José Zumárraga e à sua aluna Maria Jimena Marfil pela orientação e ajuda sobre *spoligotyping*.

À Universidade Católica Dom Bosco, que me acolhe desde a graduação, abrindo portas de conhecimentos e oportunidades.

À EMBRAPA, pelo projeto de pesquisa (processo 02.13.10.008.00.00), CNPq (processo 443235/2014-7) e FUNDECT (processo 085/2015) que concederam apoio para a realização do trabalho.

E, a Capes, que me concedeu a bolsa de estudos para a realização do mestrado em Biotecnologia.

A todos, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Taynara Nunes Pasquatti, filha de Maria Cristina Nunes e de criação de Vicínio Vieira Jardim, nascida em Aquidauana – MS, no dia 10 de Junho de 1993.

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) em 2016 e em 2017 ingressou como mestranda no programa de Pós-Graduação em Biotecnologia na mesma instituição, pesquisando na área de saúde animal e humana.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características gerais de <i>Mycobacterium bovis</i>	3
1.2 Situação epidemiológica da tuberculose bovina.....	4
1.2.1 Situação epidemiológica da tuberculose bovina na região Amazônica brasileira.....	5
1.3 Mecanismo de transmissão da tuberculose bovina.....	6
1.4 Patogenia da tuberculose bovina.....	6
1.5 Medidas preventivas e controle da tuberculose bovina.....	8
1.6 Diagnóstico da tuberculose bovina.....	8
1.6.1 Métodos moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina.....	9
1.6.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	9
1.6.1.2 Espoligotipagem (Genotipagem molecular).....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
REFERÊNCIAS.....	14
ARTIGO - Diversidade Genética de Isolados de <i>Mycobacterium bovis</i> da Região Amazônica, Brasil.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Prevalência da tuberculose bovina em rebanhos nos estados do Brasil.	4
Figura 2: Estrutura do locus cromossomal e da região DR de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG, estas que contém, respectivamente 48 e 41 DRs, intercaladas entre os espaçadores de DNA que não são repetitivos, mas que variam entre 35 a 41 pares de bases (pb) de comprimento.	11
Figura 3: Padrões de hibridação (espoligotipos) de DNAs micobacterianos amplificados	11

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bTB	Tuberculose bovina
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Repetição direta, do inglês <i>Direct Repeat</i>
ECL	Quimioluminescência melhorada, do inglês <i>Enhanced chemiluminescence</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial para Saúde Animal
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
SIE	Serviço de Inspeção Estadual

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de *Mycobacterium bovis* da região Amazônica do Brasil. Sessenta e três amostras de tecidos de bovinos e bubalinos foram obtidas em abatedouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Veterinária Estadual nos municípios de Urucará, Presidente Figueiredo, Parintins, Itacoatiara, Careiro, Careiro da Várzea, Manacapuru, Autazes/Comunidade Novo Céu, Manicoré e Apuí, estado do Amazonas; e dos municípios de Alenquer, Monte Alegre, Prainha e Óbidos, estado do Pará. As amostras foram isoladas em meio de cultivo Stonebrink, e as colônias com morfologia compatível com *M. bovis* foram analisadas por PCR convencional, com iniciadores de DNA flanqueando a região de diferenciação 4 (*Region of Difference 4* - RD4). Após confirmação, as colônias de *M. bovis* foram analisadas por espoligotipagem. Foram identificadas 44/63 (69,8%) amostras com crescimento no isolamento micobacteriano compatíveis com *M. bovis*, das quais 35 (79,5%) foram positivas para *M. bovis* na PCR. Na técnica de espoligotipagem, observou-se seis genótipos distintos (SB0822 n=17, SB0295 n=19, SB1869 n=5, SB0121 n=2, SB1800 n=1 e SB1608 n=1). Quatro genótipos (SB0295, SB0121, SB1800 e SB1869) foram descritos anteriormente em diferentes regiões do Brasil: estado da Paraíba (Nordeste), São Paulo (Sudeste), Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Centro-Oeste) e Rio Grande do Sul (Sul), bem como já foram descritos em diversos países como Argentina, Venezuela, México, Espanha e Portugal. Já os genótipos SB0822 e SB1608 não haviam sido descrito anteriormente no Brasil demonstrando assim, o polimorfismo existente entre os perfis genéticos de *M. bovis* nos animais da região Amazônica.

Palavras-chaves: Tuberculose bovina, PCR, espoligotipagem, região Amazônica

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *Mycobacterium bovis* in the Amazon region of Brazil. Sixty-three samples of bovine and buffalo tissues were obtained from slaughterhouses under the State Veterinary Inspection Service in the municipalities of Urucará, Presidente Figueiredo, Parintins, Itacaratiara, Careiro, Careiro da Várzea, Manacapuru, Autazes/Novo Horizonte Community, Manicoré and Apuí, state of Amazonas; and the municipalities of Alenquer, Monte Alegre, Prainha and Óbidos, state of Pará. Samples were grown in Stonebrink culture medium, and colonies with *M. bovis* compatible morphology were analyzed by conventional PCR, with DNA primers flanking the Region of Difference 4 (RD4). After confirmation, the colonies of *M. bovis* were analyzed by spoligotyping. 44/63 (69.8%) samples with *M. bovis* compatible mycobacterial growth were identified, of which 35 (79.5%) were positive for *M. bovis* in the PCR. In the spoligotyping technique, six different genotypes were observed (SB0822 n = 16, SB0295 n = 10, SB1869 n = 5, SB0121 n = 2, SB1800 n = 1 and SB1608 n = 1). Four genotypes (SB0295, SB0121, SB1800 and SB1869) were previously described in different regions of Brazil: state of Paraíba (Northeast region), São Paulo (Southeast region), Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Goiás (Midwest region), and Rio Grande do Sul (Southern region), also described in several countries, such as Argentina, Venezuela, Mexico, Spain and Portugal. However, the SB0822 and SB1608 genotype had not previously been described in Brazil, demonstrating the polymorphism between the genetic profiles of *M. bovis* in the Amazon region.

Keywords: Bovine tuberculosis, PCR, *spoligotyping*, Amazon region

1. INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis é o agente causador da tuberculose bovina (bTB), doença crônica, infectocontagiosa, cujos principais hospedeiros são os bovinos e bubalinos, podendo haver a propagação da infecção para outras espécies de mamíferos, inclusive humanos e animais silvestres (ETCHECHOURY et al., 2010; SMITH et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014).

A bTB é uma importante doença encontrada no mundo inteiro e persiste tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento (CORNER et al., 2011; BROUGHAN et al., 2013).

Nos países desenvolvidos, programas de controle e erradicação eliminaram a bTB por meio de estratégias de testes e abate de animais infectados (CORNER et al., 2011). No entanto, a presença de bTB em hospedeiros silvestres dificulta a erradicação em várias partes do mundo, como em Michigan, nos Estados Unidos da América (EUA), estado que alcançou o controle da bTB, mas alguns rebanhos continuam infectados devido ao foco da infecção em cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) (FINE et al., 2011). O mesmo ocorre nas ilhas da Grã-Bretanha e da Irlanda, que possuem prevalência da infecção muito maior em comparação com outros países da Europa Continental, devido ao foco da infecção em texugos europeus (*Meles meles*) dificultarem a erradicação da bTB (ALLEN et al., 2018).

O Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), possui o segundo maior efetivo de bovinos do mundo, com 218,2 milhões de cabeças, atrás apenas da Índia, e também é o segundo maior produtor de carne bovina, perdendo apenas para os EUA (BRASIL, 2016). Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), modificado em 2017, com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência dessas doenças, visando a erradicação e a diminuição do impacto negativo causado na saúde humana e animal. No caso da bTB, o PNCEBT determina o abate de todos os bovinos e bubalinos que apresentarem reação positiva ao teste tuberculínico (diagnóstico *ante-mortem*) e recomenda-se como padrão-ouro o isolamento em meio

de cultura para identificação e confirmação da infecção por *M. bovis* (diagnóstico *post-mortem*) (BRASIL, 2017a).

Em conjunto com os métodos de diagnósticos convencionais, técnicas moleculares para identificação e epidemiologia molecular da infecção por *M. bovis*, estão sendo cada vez mais empregadas. A espoligotipagem pode auxiliar o programa de controle e erradicação, por meio da discriminação de genótipos de *M. bovis*, possibilitando uma maior oferta de dados epidemiológicos (CARDOSO et al., 2009; BIEK et al., 2012).

A espoligotipagem (do inglês *spoligotyping* ou *spacer oligotyping*), é uma técnica de diagnóstico utilizada para rastrear focos da infecção de *M. bovis* por meio de genotipagem molecular, desenvolvida por Kamerbeek et al. (1997), para detectar simultaneamente e diferenciar geneticamente diversos genótipos isolados de *M. bovis*. Essa técnica utiliza um dado locus de repetição direta (do inglês, *direct repeat* - DR) do DNA micobacteriano como alvo para a amplificação de DNA *in vitro* e analisa o seu polimorfismo (KAMERBEEK et al., 1997).

A região Amazônica do Brasil está em crescente avanço na pecuária, principalmente devido aos baixos custo de terra (CARRERO et al., 2015). O estado do Amazonas ainda possui um dos menores efetivos de rebanhos da região Norte do Brasil com respectivamente, 3% e 8% de efetivo bovino e bubalino. O estado do Pará, que possui 43% de efetivo bovino e 57% de efetivo bubalino em relação aos outros estados da região Norte do Brasil, está se tornando um dos maiores produtores de bovinos do país (CARRERO et al., 2015; BRASIL, 2017b). No entanto, há relatos de rebanhos infectados por *M. bovis* em diversos municípios da região Amazônica (BARBOSA et al., 2014; SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2017).

A utilização de análises microbiológicas como o isolamento em cultura de *M. bovis* e técnicas moleculares, como a espoligotipagem, baseado em PCR, para um estudo sobre a epidemiologia da bTB na região Amazônica do Brasil, bem como nos estados do Amazonas e do Pará, é útil por se tratar de dois estados vizinhos que possuem diferentes tecnificações em sua pecuária, fazem fronteira internacional com diversos países em desenvolvimento, estando suscetíveis a movimentação de animais infectados, e pela bTB afetar diretamente a pecuária nacional, que este trabalho objetiva detectar *M. bovis* e analisar o polimorfismo, por meio dos padrões de espoligotipos existentes na região Norte do Brasil, a qual conta com

respectivamente 46% e 63% de todo rebanho bovino e bubalino do Brasil (FERREIRA; FREITAS FILHO, 2008; CORRÊA, 2011; BRASIL, 2016).

1.1 Características gerais de *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis é uma micobactéria Gram-positiva, aeróbica, que pertence à Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae, Gênero *Mycobacterium* e faz parte de um grupo de espécies causadoras de tuberculose, denominado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que causam patologias semelhantes em uma vasta variedade de hospedeiros mamíferos (SMITH et al., 2006; COOK et al., 2009).

Quando corado, *M. bovis* apresenta-se morfológicamente como cocobacilo vermelho ou haste curta de 0,3 a 0,6 µm de largura X 1 a 4 µm de comprimento e quando em esfregaço, mostra-se ligeiramente mais alongado (CORNER, 1994). É sensível ao calor, sendo a pasteurização uma forma eficiente para eliminação, bem como o fenol 5%, formaldeído, hipoclorito de sódio e a radiação ultravioleta (CAMPOS et al., 2006).

O isolamento em meio de cultura é o método internacional considerado como padrão-ouro para a confirmação *post-mortem* da bTB. Mesmo em situações de baixa prevalência, o isolamento deve ser feito de todas as lesões suspeitas para a confirmação da infecção e identificação do agente, que é realizado com base nos resultados morfológicos e características de coloração visualizados em cultura (GARRIDO et al., 2015; ABOUKHASSIB et al., 2016).

Mycobacterium bovis necessita de algumas condições apropriadas que podem influenciar no resultado do seu isolamento, como o uso de meio sólido artificial enriquecido, como o meio Stonebrink, produzido à base de ovos e piruvato de sódio, e condições adequadas de incubação, pois *M. bovis* apresenta crescimento lento, necessitando de 24 a 40 dias para que as primeiras colônias se tornem visíveis. As colônias características de *M. bovis* são pequenas, de coloração amarelo claro, arredondadas, com bordas irregulares e superfície granular (CORNER, 1994; MARCONDES et al., 2006; ROSÁRIO et al., 2014).

1.2 Situação epidemiológica da tuberculose bovina

A bTB é uma doença reconhecida mundialmente, uma vez que já foi descrita em todos os continentes, exceto na Antártica (SMITH et al., 2006; OIE, 2018). É considerada uma doença de importância econômica devido ao efeito negativo sobre a produção animal, afeta a produtividade dos animais e impacta tanto a economia, quanto a saúde pública em alguns países (SMITH et al., 2006; ABOUKHASSIB et al., 2016).

A prevalência da bTB tem sido maior em países em desenvolvimento, como em partes da África, da Ásia e das Américas (OIE, 2018), em comparação com os países desenvolvidos, que reduziram ou eliminaram a bTB no gado, mas a infecção ainda persiste na vida silvestre, como no Canadá (ANDRIEVSKAIA et al., 2018), EUA (BRUNING-FANN et al., 2017), Ilhas Britânicas (ALLEN et al., 2018) e Nova Zelândia (LIVINGSTONE et al., 2015).

No Brasil, Ferreira Neto et al. (2016) avaliaram os diferentes estudos oficiais de prevalência da bTB, realizados no Brasil, por ocasião dos 15 anos do PNCEBT. Verificou-se uma maior prevalência da bTB na região Sudeste do país, nos estados de São Paulo (ROCHA et al., 2012), Minas Gerais (PARREIRAS et al., 2012) e Espírito Santos (GALVIS et al., 2016), ocorrendo mais em fazendas de gado leiteiro, principalmente devido à aglomeração de animais no ato de ordenha (Figura 1).

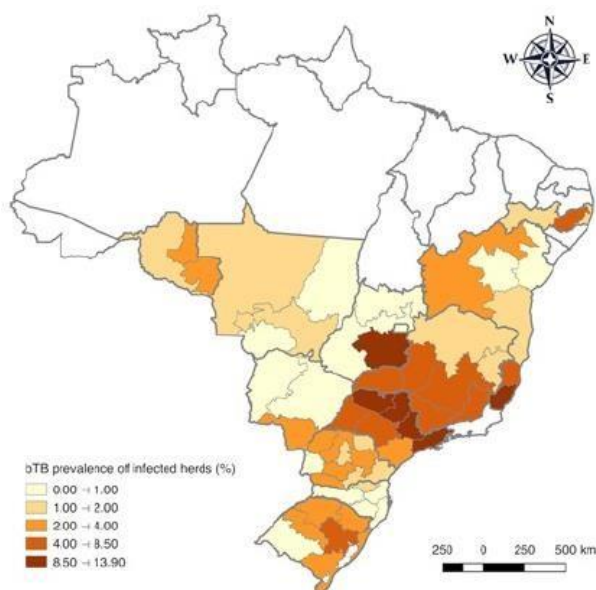


Figura 1: Prevalência da tuberculose bovina em rebanhos nos estados do Brasil. Fonte: FERREIRA NETO et al. (2016).

1.2.1 Situação epidemiológica da tuberculose bovina na região Amazônica brasileira.

A região Amazônica do Brasil também conhecida como Amazônia Legal, ocupa uma área de aproximadamente 5 milhões de quilômetros quadrados, o equivalente a dois terços do Brasil. Está presente nos estados brasileiros do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Acre, Amapá, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (CARNEIRO FILHO; SOUZA, 2009).

A região Amazônica por possuir áreas de baixo custo, apresentou crescente avanço na pecuária, se tornando a principal região produtora de bovinos do Brasil, detém da grande parte da carne produzida no país. No entanto, cerca de 80% de áreas desmatadas na Amazônia, são devido à expansão agropecuária (CARRERO et al., 2015; BRASIL, 2016).

O estado do Amazonas, o maior estado federativo do Brasil, ocupa uma área geográfica de 1.559.146,876 km², com 62 municípios incluindo Manaus sua capital, é limítrofe com os estados do Acre, Roraima, Pará, Mato Grosso e Rondônia (BRASIL, 2016). Faz fronteira internacional com a Venezuela, Colômbia e Peru, países que já relataram bTB (DE KANTOR et al., 2008; ZUMÁRRAGA et al., 2013; JOJOA-JOJOA et al., 2015).

Em 2016, o estado do Amazonas apresentou efetivo bovino de 1.315.821 cabeças de gado e 75.287 cabeças de bubalinos (BRASIL, 2016), e está entre os estados que apresentam menor produtividade na pecuária, tendo como seus principais fornecedores de bovinos o Pará, Rondônia e Mato Grosso (BILLACRÊS; NOGUEIRA, 2015), estados relatados com bTB (VENDRAME, 2013; BARBOSA et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). Entretanto, não foram encontrados registros sobre a prevalência da bTB especificamente no estado do Amazonas, apenas estudos demonstrando taxas de incidência da TB em humanos (BELO et al., 2013; GARRIDO et al., 2015).

O estado do Pará é o segundo maior estado brasileiro, com área geográfica de 1.247.955,238 km², é limítrofe dos estados de Roraima, Amazonas, Mato Grosso, Tocantins, Maranhão e Amapá. É composto por 144 municípios e sua Capital Belém. Faz fronteira internacional com Suriname e Guiana, e em 2016 apresentou efetivo bovino de 20.476.783 cabeças de gado e 519.586 cabeças de bubalino (BRASIL,

2016). Estudos, como o de Barbosa et al. (2014) relataram prevalência de bTB em 4,6% dos bubalinos investigados por meio do diagnóstico alérgico-cutâneo com tuberculina (diagnóstico *ante-mortem*) no estado do Pará. Pereira et al. (2017) analisaram 5.350 carcaças de bubalinos em dois abatedouros-frigoríficos no estado do Amapá e identificaram *M. bovis* em 15% na pesquisa de BAAR e 65% no Nested-PCR. Silva et al. (2014) analisaram carcaças de bovídeos abatidos em um matadouro-frigorífico no Amapá e observam 2,95% de lesões sugestivas de bTB em bubalinos, e 9% das carcaças condenadas por lesões sugestivas foram provenientes do estado do Pará.

1.3 Mecanismo de transmissão da tuberculose bovina

A principal fonte de infecção da bTB em um rebanho bovino ou bubalino é o contato direto com animais infectados por meio da introdução de novos animais e o transporte de animais possivelmente infectados e não detectados (BARBOSA et al., 2014; WATERS; PALMER, 2015). Há a possibilidade de animais infectados transmitirem bacilos de *M. bovis* por meio de secreções vaginais ou sêmen, fezes e urina, contaminando pastagens (ABOUKHASSIB et al., 2016).

Humanos não são os principais hospedeiros da bTB, mas podem se infectar por meio da ingestão de leite ou produtos lácteos derivados não pasteurizados de vacas infectadas (SILVA et al., 2018a) ou pelo consumo de carne crua ou pouco cozida de origem animal infectado (OIE, 2015; ABOUKHASSIB et al., 2016), e se tornarem fontes de infecção para outros animais ou mesmo para outros humanos (ETCHECHOURY et al., 2010).

A principal via de transmissão das micobactérias para as outras espécies, é por meio da inalação de gotículas contendo bacilos de *M. bovis* que geralmente são expelidos dos pulmões pela tosse dos infectados (OIE, 2018).

1.4 Patogenia da tuberculose bovina

A infecção por *M. bovis* geralmente é crônica, havendo a formação de lesões nodulares granulomatosas não vasculares, denominados de tubérculos. Sua formação tem início quando o bacilo é capturado e fagocitado por macrófagos e

células dendríticas, e caso não haja a lise dos bacilos, estes se multiplicam dentro dos macrófagos até destruí-los (ANDREWS et al., 2008; VERMA et al., 2014).

Após algumas semanas do início da infecção, os bacilos cessam a sua multiplicação em decorrência da resposta imune mediada por células e pela reação de hipersensibilidade tardia, e com o acúmulo de células inflamatórias inicia-se a formação do granuloma (tubérculos) (ANDREWS et al., 2008; ABOUKHASSIB et al., 2016).

As lesões macroscópicas geralmente são: aumento de volume dos linfonodos com granulomas formados por exsudato caseoso seco e mineralizado de coloração amarelo-esbranquiçado a verde-esbranquiçado. Podem também apresentar aspecto purulento, com cápsula fibrosa, com ou sem necrose de caseificação no centro da lesão ou calcificação, e granulomas similares no parênquima pulmonar que podem-se distribuir de forma aleatória nos pulmões ou em todos os lobos pulmonares (ZACHARY; MCGAVIN, 2013).

As lesões tuberculosas podem ser encontradas em qualquer tecido do animal, mas ocorrem com mais frequência nos pulmões, fígado, baço, linfonodos traqueobrônquicos, mediastinais, retrofaríngeos e brônquicos. As lesões pulmonares comumente iniciam-se na junção bronquíolo-alveolar com propagação para outros tecidos, podendo progredir, estabilizar ou regredir. Seu caminho é determinado com base na virulência da micobactéria, carga infectante e resistência do hospedeiro (ZACHARY; MCGAVIN, 2013; SOUZA et al., 2014; VERMA et al., 2014).

A bTB por ser uma doença de evolução lenta, a fase inicial é assintomática e mesmo em estágios avançados, os sinais clínicos normalmente demoram meses ou anos para se manifestar (OIE, 2018).

Os sinais clínicos, quando presentes, dependendo da localização das lesões, podem variar entre tosse crônica, aumento acentuado da frequência respiratória, além de dispneia, alteração na temperatura corpórea, caquexia progressiva, hiperplasia de linfonodos, mastite, aumento de volume dos linfonodos supramamários, infertilidade ou aborto e em alguns casos diarreia (ANDREWS et al., 2008; VERMA et al., 2014; OIE, 2018).

1.5 Medidas preventivas e controle da tuberculose bovina

Os testes de diagnósticos e o abate de animais reagentes são normalmente as medidas empregadas em todo o mundo para o controle da bTB, já que não se realiza o tratamento devido à característica de cronicidade da doença e o risco à saúde pública (ANDREWS et al., 2008; WHELAN et al., 2010).

Algumas medidas devem ser realizadas constantemente para evitar a transmissão de *M. bovis* entre animais e humanos, como o monitoramento do rebanho, controle de trânsito animal, inspeção sanitária sistemática nos abatedouros-frigoríficos, principalmente pelo risco de transmissão em seus funcionários (magarefes) e a pasteurização do leite e seus derivados (GATHOGO et al., 2012; ABOUKHASSIB et al., 2016; OIE, 2018).

Deve-se utilizar instalações adequadas nas propriedades, tanto rural quanto em abatedouros-frigoríficos, bem como fazer a higienização e a desinfecção periodicamente do local, com hipoclorito de sódio 5%, fenol 5% ou formaldeído 3%, além de proporcionar boa ventilação e luz solar ao ambiente, para evitar contaminação (BRASIL, 2017b).

A erradicação da bTB ainda é uma meta difícil de ser alcançada, principalmente em países em desenvolvimento, pois envolve diversos recursos, inclusive financeiros. No entanto, o controle pode ser obtido, por meio de medidas para evitar a transmissão do agente infeccioso e a participação ativa de todos os envolvidos, como produtores rurais, veterinários e políticos (VALENTE et al., 2011).

1.6 Diagnóstico da tuberculose bovina

O diagnóstico da bTB é realizado de forma direta ou indireta. O diagnóstico direto é por meio da detecção e a identificação do agente etiológico no material biológico e indireto busca uma resposta imunológica do hospedeiro frente ao agente etiológico, utilizando testes alérgicos de tuberculinização intradérmica (FIRDESSA et al., 2012; BRASIL, 2017b).

O diagnóstico alérgico-cutâneo com tuberculina (teste tuberculínico) é o método celular *in vivo* indicado pelo PNCEBT. É realizado com extratos antigênicos proteicos purificados (PPD, do inglês, *Purified Protein Derivate*), obtidos a partir do

isolamento pelo cultivo de cepas conhecidas de *M. bovis* (PPD bovino) e de *Mycobacterium avium* (PPD aviário) (ANDREWS et al., 2008; JORGE, 2010).

Após a realização do teste tuberculínico, o animal sadio não apresentará resposta, já o animal infectado produzirá um edema progressivo no local da aplicação do PPD em no máximo 72 ± 6 horas, devido à reação de hipersensibilidade tardia (WHELAN et al., 2010; BRASIL, 2017b).

Para o diagnóstico direto, a Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) recomenda que o isolamento em meio de cultura seja o método padrão-ouro para a identificação e confirmação da infecção por *M. bovis*. Entretanto, o isolamento necessita de no mínimo seis semanas para que haja início do crescimento micobacteriano no meio artificial, devido à característica de crescimento lento, que requer entre 10 a 12 semanas para a confirmação de *M. bovis* (OIE, 2015; SILVA et al., 2018b).

Além dos métodos convencionais para o diagnóstico da bTB, há outros que dão apoio ao diagnóstico final, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica baseada na amplificação de um fragmento do DNA que auxilia na detecção direta de diversas doenças em um curto período de tempo.

1.6.1 Métodos moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina

1.6.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Técnicas de biologia molecular são cada vez mais empregadas junto aos métodos de diagnósticos diretos convencionais de bTB, sendo mais promissores na detecção direta em amostras clínicas, pois diminui o tempo necessário para a identificação do agente por técnicas mais rápidas, avalia a variabilidade genética da espécie e geralmente depende apenas da quantidade de DNA para análise (KONEMAN, 2008; SCHILLER et al., 2011; ABOUKHASSIB et al., 2016).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser utilizada na detecção direta em tecidos, leite, queijo, dentre outros materiais biológicos. Rahman et al. (2015) diagnosticaram bTB baseando-se em PCR, em amostras de leite bovino (12,33%) e escarro humano (6,67%) e Parra et al. (2008) citam que a PCR pode ser

uma ferramenta epidemiológica importante para testes de campo em bovinos e para programas de vigilância.

Araújo et al. (2014) relataram que, para a detecção direta da bTB em tecidos, a presença de fibrose e calcificação em lesões sugestivas de tuberculose pode resultar em pequena concentração de DNA de *M. bovis* após a purificação, limitando a sensibilidade da PCR, e que uma alternativa para melhorar o desempenho é submeter o DNA a duas etapas de amplificação (Nested-PCR) para a detecção direta em tecidos.

A PCR é uma técnica *in vitro* de fácil execução que possibilita a detecção e à amplificação simultânea de um fragmento específico do DNA, independente da espécie do microrganismo. É uma técnica amplamente utilizada para a detecção de agentes patogênicos em estudos moleculares, permitindo assim, avanços epidemiológicos pela caracterização de vários agentes causadores de diversas enfermidades (ETTER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

A PCR é um método de identificação de alta sensibilidade e especificidade, considerada uma ferramenta padrão para a epidemiologia, controle e erradicação de diversas doenças, além de ser uma alternativa de diagnóstico rápido e específico para os métodos diretos (KONEMAN, 2008; VERMA et al., 2014).

1.6.1.2 Espoligotipagem (Genotipagem molecular)

A espoligotipagem (do inglês, *spoligotyping* ou *spacer oligotyping*), é um método de genotipagem molecular baseado em PCR, em que há a amplificação do locus cromossomal de micobactérias. Essa região cromossomal contém diversas e pequenas regiões de repetição direta (DR, do inglês, *Direct Repeat*), cada DRs são intercaladas com sequências de espaçadores único e não repetitivos que estão presente apenas em bactérias do CMT. Quando as regiões DRs, são comparadas a outras cepas isoladas do CMT, observa-se uma sequência de espaçadores (Figura 2), com deleções e inserções de DRs (KAMERBEEK et al., 1997).

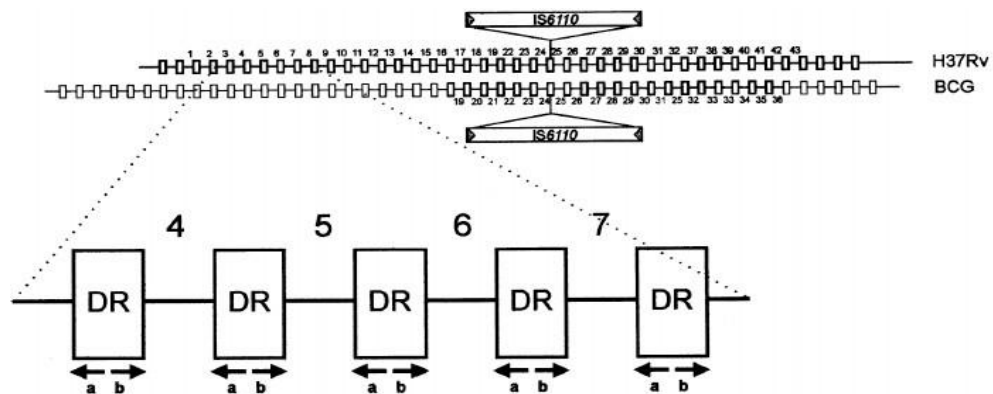


Figura 2: Estrutura do locus cromossomal e da região DR de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG, estas que contém, respectivamente 48 e 41 DRs, intercaladas entre os espaçadores de DNA que não são repetitivos, mas que variam entre 35 a 41 pares de bases (pb) de comprimento. Fonte: KAMERBEEK et al., (1997).

Kamerbeek et al. (1997) desenvolveram a espoligotipagem com o objetivo de fornecer dados sobre a região DR de cepas do CMT presente em outras espécies, e utiliza as DRs como alvo para a amplificação do DNA *in vitro*. Com a amplificação da região DR de uma determinada cepa por PCR, a espoligotipagem detecta a presença ou ausência dos espaçadores de sequência conhecida (Figura 3). Em suma, a espoligotipagem é uma técnica que, pela variação entre a presença e ausência das sequências dos espaçadores, fornece diferentes tipos de padrões de hibridação do DNA amplificado (KAMERBEEK et al., 1997; SMITH et al., 2006; RAMOS et al., 2014).



Figura 3: Padrões de hibridação (espoligotipos) de DNAs micobacterianos amplificados. Fonte: KAMERBEEK et al., (1997).

A amplificação dos espaçadores, ocorre devido à utilização de iniciadores na sequência DR. O iniciador a jusante (DRa) é biotinilado (alta afinidade a estreptavidina) e o iniciador a montante (DRb) é marcado com biotina (KAMERBEEK et al., 1997).

A hibridação do produto da PCR é realizada em uma membrana que contém 43 oligonucleotídeos que se ligam covalentemente com os espaçadores das sequências DRs (KAMERBEEK et al., 1997).

A detecção dos sinais de hibridação podem ser visualizados após a membrana ser incubada em estreptavidina peroxidase, enzima que se liga à biotina durante a PCR, e os sinais de hibridação são otimizados pelo sistema de detecção de quimiluminescência melhorada (ECL), método indireto não radioativo (KAMERBEEK et al., 1997).

A genotipagem molecular por espoligotipagem permite a diferenciação de cepas de *M. bovis* de outros membros do CMT, e a análise do polimorfismo entre as cepas isoladas, auxilia na identificação das fontes de infecção e no rastreamento de focos da doença. Auxilia em estudos sobre a transmissão da bTB entre espécies e oferta dados sobre a prevalência da bTB (KAMERBEEK et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2012; RAMOS et al., 2014; GOMES, 2016).

A espoligotipagem é um método de baixo custo, discriminatório e de fácil distinção entre cepas do complexo *M. tuberculosis*. No banco de dados internacional da Universidade de Complutense de Madri, Espanha (www.mbovis.org), pode-se buscar os distintos padrões de espoligotipos existentes no mundo inteiro auxiliando assim, a busca epidemiológica de *M. bovis* (ZUMÁRRAGA et al., 2013; RAMOS et al., 2014).

Por se tratar de uma técnica que auxilia no entendimento da epidemiologia molecular de *M. bovis*, este estudo objetiva, por meio da espoligotipagem, analisar a diversidade genética de *M. bovis* isolados a partir de tecidos de bovinos e bubalinos abatidos em abatedouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Veterinária Estadual (SIE) dos estados do Amazona e do Pará, região Amazônica do Brasil e comparar os espoligotipos identificados, com outras regiões do Brasil e do mundo.

O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas da revista *Veterinary Research*, Qualis A2 na área de Biotecnologia.

2.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a diversidade genética de cepas de *Mycobacterium bovis*, isoladas a partir de tecidos de bovinos e bubalinos com lesão sugestiva de tuberculose, dos estados do Amazonas e Pará, por meio da técnica de espoligotipagem.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar *M. bovis* a partir de tecidos de bovinos e bubalinos, provenientes de rebanhos infectados, obtidos em abatedouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Estadual (SIE) dos estados do Amazonas e Pará;
- confirmar a identidade de *M. bovis* pela técnica de PCR, a partir dos isolados no cultivo micobacteriano; e
- caracterizar e analisar a diversidade genética de *M. bovis* pela técnica de espoligotipagem.

REFERÊNCIAS

ABOUKHASSIB, H.; HARAJI, M.; BOUSLIKHANE, M.; BITAR, A. Bovine Tuberculosis: Clinical Presentation and Diagnosis. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v.3, n.2, p.57, 2016.

ALLEN, A. R.; SKUCE, R. A.; BYRNE, A. W. Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland – A Perfect Storm? The Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Infectious Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 109, 2018.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos. 2.ed.; **Revisão científica José Jurandir Fagliari**; tradução Paulo Marcos Agria de Oliveira]. ISBN: 978-85-7241-737-2, São Paulo, 2008.

ANDRIEVSKAIA, O.; TURCOTTE, C.; BERLIE-SURUJBALLI, G.; BATTALION, H.; LLOYD, D. Genotypes of *Mycobacterium bovis* strains isolated from domestic animals and wildlife in Canada in 1985-2015. **Veterinary Microbiology** v.214, p.44-50, 2018.

ARAÚJO, C. P.; OSORIO, A. L.; JORGE, K. S.; RAMOS, C. A.; FILHO, A. F.; VIDAL, C. E.; *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. **PLoS One**, v.9, n.3, p.e91023, 2014.

BARBOSA, J. D.; SILVA, J. B.; RANGEL, C. P.; FONSECA, A. H.; SILVA, N. S.; BOMJARDIM, H. A.; FREITAS, N. F. Q. R. Tuberculosis prevalence and risk factors for water buffalo in Pará, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, p.513-517, 2014.

BELO, E. N.; ORELLANA, J. D. Y.; LEVINO, A.; BASTA, P. C. Tuberculose nos municípios amazonenses da fronteira Brasil-Colômbia-Peru-venezuela: situação epidemiológica e fatores associados ao abandono. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.34, n.5, 2013.

BIEK, R.; O'HARE, A.; WRIGHT, D.; MALLON, T.; MCCORMICK, C.; ORTON, R. J.; MCDOWELL, S.; TREWBY, H.; SKUCE, R. A.; KAO, R. R. Whole Genome SEquencing Reveals Local Transmission Patterns of *Mycobacterium bovis* in Sympatric Cattle and Badger Populations. **PLoS Pathogens**, v.8, n.11 p.e1003008, 2012.

BILLACRÊS, M. A. R.; NOGUEIRA, R. J. B. Aspectos da Pecuária Bovina no Amazonas: Produção, Transporte e Beneficiamento. **G. Ciências Humanas**. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2015.

BRASIL (2016). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas (IBGE). **Coordenação de Produção da Pecuária Nacional**, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso em 02 Mar. 2017.

BRASIL (2017a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa SDA Nº10, de 3 de março de 2017. Publicada no DOUNº116**, 2017, v.1, p.4-8. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSA/PECEBT/IN_SDA_10_2017_PNCEBT.pdf>. Acesso 15 Nov. 2017

BRASIL (2017b). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Diretoria de Pesquisas - Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com data de referência 1º de julho de 2017**, 2017. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?lang=&sigla=am>>. Acesso em: 10 de Nov. de 2017.

BROUGHAN, J. M.; DOWNS, S. H.; CRAWSHAW, T. R.; UPTON, P. A.; BREWER, J.; CLIFTON-HADLEY, R. S. *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-

bovine mammalian species. Part 1: review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. **The Veterinary Journal** v.198, p.339–345, 2013.

BRUNING-FANN, C.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; KANEENE, J. B.; THOMSEN, B. V.; RAY, J. S.; SMITH, R. W.; FITZGERALD, S. D.; BOLIN, S. R.; MULLANEY, T. P.; STUBER, T. P.; AVERILL, J. J.; MARKS, D. Use of Whole-genome sequencing and evaluation of the apparent sensitivity and specificity of antemortem tuberculosis tests in the investigation of an unusual outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a Michigan dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.25, n.2, 2017.

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v.15, n.1, p.29-35, 2006.

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

CARNEIRO FILHO, A.; SOUZA, O. B. Atlas de pressões e ameaças às terras indígenas na Amazônia brasileira. São Paulo: **Instituto Socioambiental**. ISBN978-85-85994-716, 2009.

CARRERO, G. C.; ALBUJA, G.; FRIZO, P.; HOFFMANN, E. K.; ALVES, C.; BEZERRA, C. S. A Cadeia Produtiva da Carne Bovina no Amazonas. Manaus: **Instituto de Conservação e Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**, p.44, 2015. Disponível em: <https://d3nehc6yl9qzo4.cloudfront.net/downloads/cadeia_produtiva_corte_amazonas.pdf>. Acesso 23 Jul. 2018.

CARVALHO, R. C. T.; VASCONCELLOS, S. E. G.; ISSA, M. A.; SOARES-FILHO, P. M.; MOTA, P. M. P. C.; ARAÚJO, F. R.; CARVALHO, A. C. S.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N.; FIGUEIREDO, E. E. S.; PASCHOALIN, V. M. F. Molecular Typing of

Mycobacterium bovis from Cattle Reared in Midwest Brazil. **PLoS ONE**, v.11, n.9, p.e0162459, 2016.

COOK, G. M.; BERNEY, M.; GEBHARDET, S.; *et al.* Physiology of Mycobacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v.55, n.81-319, p.1-77, 2009.

CORNER, L. A. L. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology** v.50, p.53-63, 1994.

CORNER, L. A. L.; MURPHY, D.; GORMLEY, E. *Mycobacterium bovis* Infection in the Eurasian Badger (*Meles meles*): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. **Journal of Comparative Pathology**, v.144, p.1-24, 2011.

CORRÊA, F. A. F. Formas de Diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. Apresentado à Universidade Federal de Goiás, Escola de veterinária, **Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**, 2011. Disponível em: <https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Fernando_Augusto_1.pdf>. Acesso em 01 Mar. 2018.

DE KANTOR, I. N.; AMBROGGI, M.; POGGI, S.; MORCILLO, N.; TELLES, M. A. S.; RIBEIRO, M. O.; TORRES, M. C. G.; POLO, C. L.; RIBÓN, W.; GARCÍA, V.; KUFFO, D.; ASENCIOS, L.; CAMPOS, L. M. V.; RIVAS, C.; WAARD, J. H. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis (Edinburgh)**, v.88, p.358-365, 2008.

ETCHECHOURY, I.; VALENCIA, G. E.; MORCILLO, N.; SEQUEIRA, M. D.; IMPERIALE, B.; LÓPEZ, M.; CAIMI, K.; ZUMÁRRAGA, M. J.; CATALDI, A.; ROMANO, M. I. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First Description of a Person-to-Person Transmission Case. **Zoonoses Public Health**, v.57, p.375-381, 2010.

ETTER, E.; DONADO, P.; JORI, F.; CARON, A.; GOUTARD, F.; ROGER, F. Risk Analysis and Bovine Tuberculosis, a Re-emerging Zoonosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, p.61-73, 2006.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3385-3402, 2016.

FERREIRA, W. L.; FREITAS FILHO, J. R. Avaliação da qualidade físico-químico do queijo coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, n.1, p.127-133, 2008.

FIGUEIREDO, E. E. S.; RAMOS, D. F.; MEDEIROS, L.; SILVESTRE, F. G.; LILENBAUM, W.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. W. F.; DELLAGOSTIN, O. A. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herdo f cattle. Elsevier Ltd. **The Veterinary Journal**, v.193, p.296-298, 2012.

FINE, A. E.; BOLIN, C. A.; GARDINER, J. C.; KANEENE, J. B. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. **Veterinary Medicine International**, 2011.

FIRDESSA, R.; TSCHOPP, R.; WUBETE, A.; SOMBO, M.; HAILU, E.; ERENDO, G.; LIROS, T.; YAMUAH, L.; VORDERMEIER, M.; HEWINSON, R. G.; YOUNG, D.; GORDON, S. V.; SAHILE, M.; ASEFFA, A.; BERG, S. High Prevalence of Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle in Central Ethiopia: Implications for the Dairy Industry and Public Health. **PLoS ONE**, v.7, n.12, p.e52851, 2012.

GALVIS, J. O. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DA COSTA, D.; SAID, A. L. P. R.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santos, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, supl.2, p.3567-3578, 2016.

GARRIDO, M. D.; BURHRER-SÉKULA, S.; SOUZA, A. B.; RAMASAWNY, R.; QUINCÓ, P. L.; MONTE, R. L.; SANTOS, L. O.; PEREZ-PORCUNA, T. M.;

MARTINEZ-ESPÍNOSA, F. E.; SARACENI, V.; CORDEIRO-SANTOS, M. Temporal Distribution of Tuberculosis in the State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, supl.I, p.63-69, 2015.

GATHOGO, S. M.; KURIA, J. K. N.; OMBUI, J. N. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a post-mortem, microbiological and DNA molecular study. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.1739-1744, 2012.

GOMES, L. L. Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Mycobacterium tuberculosis* da Família Beijing do Tipo ancestral e Moderno. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) – **Instituto Oswaldo Cruz**, 2016.

JOJOA-JOJOA, J.; WINTACO, M.; OSORIO, F.; PUERTO-CASTRO, G.; GUERREIRO-GUERREIRO, M. First approach to molecular epidemiology of bovine tuberculosis in Colombia. **Revista MVZ Córdoba**, 2016.

JORGE, K. S. G. Identificação de *Mycobacterium bovis* em Bovinos e sua Importância na Ocorrência de Tuberculose zoonóticas. Campo Grande – MS, 2010.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MONLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.907-914, 1997.

KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Revisão técnica Eiler Fritsch Toros; tradução Eiler Fritsch Toros *et al.* – Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

LIVINGSTONE, P. G.; HANCOX, N.; NUGENT, G.; DE LISLE, G. W. Toward eradication: the effect of *Mycobacterium bovis* infection in wildlife on the evolution and future direction of bovine tuberculosis management in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.63, p.4-18, 2015.

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

OIE. World Organization for Animal Health. Bovine Tuberculosis. Terrestrial Manual. 2015, v.1, chapter 2.4.7. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acesso 13 Fev. 2018.

OIE. World Organization for Animal Health. Bovine Tuberculosis. 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bovine-tuberculosis/>>. Acessado 24 Jul. 2018.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. Fundamentos Teórico-Práticos e Protocolos de Extração e de Amplificação de DNA por meio da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase [recurso eletrônico]. /Márcia Cristina de Sena Oliveira [et al.] – São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2007. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso 12 Set. 2017.

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; MENDOZA, J. H. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.315-324, 2008.

PARREIRAS, P. M.; ANDRADE, G. I.; NASCIMENTO, T. F.; OELEMANN, M. C.; GOMES, H. M.; ALENCAR, A. P.; ASSIS, R. A.; MOTA, P. M. P. C.; PEREIRA, M. A. S.; LOBATO, F. C. F.; LAGE, A. P.; SUFFYS, P. N. Spoligotyping and variable

number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* from cattle in Brazil.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.107, n.1, p.64-73, 2012.

PEREIRA, J. D. B.; CERQUEIRA, V. D.; BEZERRA JUNIOR, O. S.; BEZERRA, D. K. O.; ARAÚJO, F. R.; DIAS, A. C. L.; ARAÚJO, C. P.; RIET-CORREA, G. 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.

RAHMAN, M. M.; NOOR, M.; ISLAM, K. M.; UDDIN, M. B.; HOSSAIN, F. A. H.; ZINNAH, M. A.; MAMUN, M. A.; ISLAN, M. R.; EO, S. K.; ASHOUR, H. M. Molecular diagnosis of bovine tuberculosis in bovine and human samples: implications for zoonosis. **Future Microbiology**, v.10, n.4, p.527-535, 2015.

RAMOS, D. F.; SILVA, A. B. S.; FAGUNDES, M. Q.; GROLL, A.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.2, p.657-660, 2014.

ROCHA, V. C. F.; FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A. R.; GRISI-FILHO, J. H. H.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. XX, 2012.

ROSÁRIO, T. R.; DIB, C. C.; ROXO, E.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, A. S.; BENITES, N. R. Thin layer microcolony culture associated with PCR for early identification of *Micobacterium bovis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.225-230, 2014.

SCHILLER, I.; RAYWATERS, W.; VORDERMEIER, H. M.; JEMMI, T.; WELSH, M.; KECK, N.; WHELAN, A.; GORMLEY, E.; BOSCHIROLI, M. L.; MOYEN, J. L.; VELA, C.; CAGIOLA, M.; BUDDLE, B. M.; PALMER, M.; THACKER, T.; OESCH, B. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade surveillance and diagnostics. **Elsevier BV Veterinary Microbiology**, v.151, p.153-159, 2011.

SILVA, L. B. A.; ESTEVES, C.; FARIA, P. B.; TEIXEIRA, J. T.; ARAÚJO, T. S. Prevalência de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos no Amapá, Brasil. **PUBVET**, v.8, n.12, ed.261, art.1732, 2014.

SILVA, M. R.; ROCHA, A. S.; ARAÚJO, F. R.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; DE ALENCAR, A. P.; SUFFYS, P. N.; DA COSTA, R. R.; MOREIRA, M. A. S.; GUIMARÃES, M. D. C. Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.113, n.8, p.e170445, 2018a.

SILVA, S. C. G.; ALVES, A. D. F.; ALMEIDA, T. J. O.; SÁ, P. C. L.; SOUZA FILHO, A. F.; CÁRDENAS, N. C.; FERREIRA NETO, J. S.; HEINEMAN, M. B.; AZEVEDO, S. S.; TORRES, M. B. A. M. Isolation and Identification of *Mycobacterium bovis* in Cattle Slaughtered from na Abattoir in Garanhuns, Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.39, n.1, p.157-166, 2018b.

SMITH, N. H.; GORDON, S. V.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CLIFTON-HADLEY, R. S.; HEWINSON, R. G. Bottleneks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature**, v.4, p.670-681, 2006.

SMITH, R. L.; TAUER, L. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LU, Z.; GROHN, Y. T. Minimization of bovine tuberculosis control costs in US dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.112, p.266-275, 2013.

SOUZA, M. A.; BOMBANATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; SANTOS, M. P.; GANDA, M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.4, p.363-367, 2014.

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

VENDRAME, F. B. Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Rondônia. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. **Departamento de Medicina veterinária Preventiva e Saúde Animal**, São Paulo, 2013.

VERMA, A. K.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; SAMINATHAN, N. M.; DHAMA, K.; SINGH, S. V. Various Approaches for its Diagnosis, Control and its Public Health Concerns: An Update. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, p.323-344, 2014.

WATERS, W. R.; PALMER, M. V. *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle and White-Tailed Deer: TRanslational Research of Relevance to Human Tuberculosis. **ILAR Journal**, v.56, n.1, p.26-43, 2015.

WHELAN, A. O.; CLIFFORD, D.; UPDHYAY, B.; BREADON, E. L.; MCNAIR, J.; HEWINSON, G. R.; VORDRMEIER, M. H. Development of a Skin Test for Bovine Tuberculosis for Differentiating Infected from Vaccinated Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, p.3176-3181, 2010.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia Veterinária. 5. Ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2013.

ZUMÁRRAGA, M. J.; ARRIAGA, C.; BARANDIARAN, S.; COBOS-MARIN, L.; DE WAARD, J.; ESTRADA-GARCIA, I.; FIGUEIREDO, T.; FIGUEROA, A.; GIMENEZ, F.; GOMES, H. M.; GONZALEZ, Y. M. J.; MACIAS, A.; MILIAN-SUAZO, F.; RODRIGUEZ, C. A.; SANTILLAN, M. A.; SUFFYS, P. N.; TRANGONI, M. D.; ZUMÁRRAGA, A. M.; CATALDI, A. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. **Research in Veterinary Science**, v.94, p.9–21, 2013.

ARTIGO

**Diversidade Genética de Isolados de *Mycobacterium bovis* da Região
Amazônica, Brasil.**

Revista:
Veterinary Research

Diversidade Genética de Isolados de *Mycobacterium bovis* da Região Amazônica, Brasil.

Taynara Nunes Pasquatti¹, Gisele Olivas de Campos Leguizamon², Paulo A. M. Carneiro³, María Jimena Marfil⁴,
Martín José Zumárraga⁴ e Flávio Ribeiro de Araújo²

¹Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Avenida Tamandaré 6000, Jardim Seminário, Campo Grande, MS 79117-900, Brasil. Pesquisa de mestrado com apoio CAPES. tay.pasquatti@gmail.com.

²Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia 830, Zona Rural, Campo Grande, MS 79106-550, Brasil.

³Center for Comparative Epidemiology, Michigan State University, 736 Wilson Road, Room A-106, East Lansing, MI 48824, USA.

⁴Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar; CC 25, 1712 Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Contagem de palavras: 3.459 palavras com 1 tabela e 1 dendrograma.

Artigo será submetido para: Veterinary Research

Versão: 1

Autor para correspondência: Taynara Nunes Pasquatti, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Avenida Tamandaré 6000, Jardim Seminário, Campo Grande, MS 79117-900, Brasil.

E-mail: tay.pasquatti@gmail.com

Agradecimentos

À Universidade Católica Dom Bosco, Embrapa (Processo: 02.13.10.008.00.00), CNPq (Processo: 443235/2014-7), FUNDECT (Processo: 085/2015) e à Capes pelo financiamento deste trabalho.

30 RESUMO

31 O objetivo deste estudo foi isolar *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de tecidos de bovinos e bubalinos
32 com lesões sugestivas de tuberculose (LST), oriundos dos estados do Amazonas e Pará e analisar a diversidade
33 genética dos mesmos por espoligotipagem. Foram obtidos tecidos de 57 animais no Amazonas (12 bovinos e 45
34 bubalinos) e seis do Pará (cinco bovinos e um bubalino), provenientes de abatedouros-frigoríficos sob Inspeção
35 Veterinária Estadual (SIE) com LST, os quais foram isolados em meio de cultura Stonebrink. As colônias
36 obtidas foram analisadas pela técnica de espoligotipagem e os padrões obtidos submetidos à busca de homologia
37 no website Mbovis.org (<http://www.mbovis.org/>). Houve crescimento bacteriano em 44 (69,8%) dos tecidos dos
38 63 animais, dos quais a PCR para RD4 identificou 35/44 (79,5%) como *M. bovis*. Por meio da espoligotipagem,
39 foram identificados seis padrões distintos, dos quais SB0295, SB1869, SB0121, SB1800 já haviam sido descritos
40 no Brasil e SB0822 e SB1608 ainda não. Coincidentemente o espoligotipo mais frequente neste estudo (SB0822)
41 já havia sido descrito em búfalos na Colômbia, país vizinho do estado do Amazonas. Os outros espoligotipos
42 identificados também foram descritos em outros países da América do Sul, como na Argentina e Venezuela e
43 descritos nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso
44 do Sul, Mato Grosso e Goiás, indicando uma movimentação ativa de cepas de *M. bovis* dentro do Brasil.

45 **Palavras-chave:** Tuberculose bovina, PCR, espoligotipagem.

47 INTRODUÇÃO

48 A tuberculose bovina é uma doença crônica, infectocontagiosa causada por *Mycobacterium bovis*,
49 membro de um grupo denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que inclui micobactérias
50 causadoras de tuberculose como *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M.*
51 *caprae*, *M. bovis*, *M. suricattae*, *M. mungi* e *M. orygis* [1,2].

52 A tuberculose bovina acomete preferencialmente bovinos e bubalinos, mas pode ocasionalmente
53 infectar outras espécies mamíferas, inclusive humanos [3,4]. Pode se disseminar por meio do contato direto com
54 animais infectados, ocasionando a propagação da doença entre regiões e rebanhos ou em animais silvestres [5,6],
55 ou ser transmitida pelo contato indireto por meio de equipamentos, água e alimentos contaminados [7,8].

56 A bTB é uma doença reconhecida mundialmente, pois persiste tanto em países desenvolvidos, quanto
57 em países em desenvolvimento [9,10]. No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
58 estabeleceu em 2001 e modificou em 2017, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e

Tuberculose Animal (PNCEBT), com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência da bTB. O regulamento determina o abate de todos os bovinos e bubalinos que apresentarem reação positiva ao teste tuberculínico (diagnóstico *ante-mortem*) e como padrão-ouro, o isolamento em meio de cultura para identificação e confirmação de uma infecção por *M. bovis* (diagnóstico *post-mortem*) [11].

Técnicas moleculares estão sendo cada vez mais utilizadas como apoio aos métodos convencionais, tanto para a identificação e confirmação de cepas de *M. bovis*, quanto para epidemiologia molecular. A genotipagem molecular por espoligotipagem é uma técnica desenvolvida por Kamerbeek et al. [12] que discrimina genótipos de *M. bovis* por meio da amplificação do locus cromossomal de micobactérias, que contém inúmeras regiões de repetição direta (DR, do inglês, *Direct Repeat*). Essas regiões DRs, que estão presente apenas em bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), são intercaladas entre sequências de espaçadores não repetitivos e após sua amplificação por PCR, identifica-se a presença ou ausência dos espaçadores. A espoligotipagem, por discriminar genótipos de *M. bovis*, por meio de padrões de hibridação do DNA amplificado, pode auxiliar em programas de controle de bTB, fornecendo dados epidemiológicos entre as cepas isoladas [12,7,13].

Nesse contexto, este estudo objetiva o isolamento e genotipagem por espoligotipagem de cepas de *M. bovis* da região Amazônica.

MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram obtidas 63 amostras de tecidos bovinos (n=17) e bubalinos (n=46), com e sem lesões sugestivas de tuberculose, provenientes de rebanhos infectados, em abatedouros-frigoríficos de Serviço de Inspeção Veterinária Estadual (SIE), de dez municípios amazonenses e quatro municípios paraenses (Tabela 1). O rebanho foi considerado infectado quando apresentou pelo menos um animal com LST no lote abatido. Os animais foram abatidos com finalidade comercial. Desta forma, não houve sacrifício de animais especificamente para este estudo.

As amostras foram encaminhadas em embalagem plástica estéril contendo apenas o número de Guia de Trânsito Animal (GTA) e a espécie do animal, porém sem informações sobre o tecido, raça, sexo ou idade. As amostras foram transportados, sob refrigeração, em recipiente de isopor com gelo artificial ao Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, situado em Campo Grande – MS, para posterior análise.

89

90 Preparo e cultivo das amostras

91 Fragmentos de aproximadamente 2g de cada amostra de tecido foram macerados manualmente com
92 auxílio de lâmina de bisturi em placa de Petri estéril. Os tecidos macerados foram colocados em tubos com
93 esferas de cerâmica de 1,4mm de diâmetro (*MagNa Lyse Green Beads* -Roche Life Science), sendo adicionado a
94 cada tudo 1 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados em aparelho *MagNa Lyser* (Roche
95 Diagnostic GmbH, Germany) com rotação de 5.000 rpm por 30 segundos, duas vezes seguidas. Em seguida, os
96 tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 min com posterior descontaminação pelo método de Petroff [14].
97 O material descontaminado foi semeado em tubos contendo meio Stonebrink, com posterior incubação à 37°C, e
98 avaliados semanalmente durante 90 dias, para verificar o crescimento bacteriano. As colônias com características
99 sugestivas de *M. bovis* foram submetidas à extração de DNA.

100 Extração do DNA

101 As colônias bacterianas foram lavadas com 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE) em microtubos e
102 inativadas em banho seco durante 1h a 87°C, com posterior centrifugação a 14.000 rpm por 2min. O sedimento
103 formado foi descartado e o sobrenadante contendo o DNA micobacteriano foi transferido para novos microtubos
104 e armazenados a -20°C para análise subsequente.

105 Identificação do agente por PCR

106 Os DNAs micobacterianos foram submetidos à PCR convencional de acordo com Sales et al. [15],
107 utilizando os iniciadores Mb.400.F (5'AACGCGACGACCTCATATTC3') e Mb.400.R
108 (5'AAGGCGAACAGATTCAGCAT3'), que amplificam um fragmento de DNA de 400 pares de bases (pb)
109 flanqueando a região de diferenciação 4 (*Region of Difference 4* -RD4), específica de *M. bovis* [15]. Os produtos
110 da PCR foram corados com Gel Red e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e
111 visualizados em fotodocumentador, sob luz ultravioleta.

112 Espoligotipagem

113 A espoligotipagem foi realizada nos isolados de *M. bovis*, seguindo as instruções de Kamerbeek et al.
114 [12]. A hibridação do produto da PCR foi realizada em uma membrana de espoligotipagem com 43
115 oligonucleotídeos de sequências espaçadoras, conforme as instruções do fabricante (Isogen Life Sciences). A
116 membrana foi incubada com estreptavidina-peroxidase e os espaçadores foram detectados por
117 quimioluminescência ECL (ECL Detection kit, Amersham Pharmacia Biotech), seguido pela exposição de um
118 filme de raio X à membrana. Os padrões visualizados no filme de raio X foram comparados aqueles contidos no

119 banco de dados do *website* Mbovis.org (<http://www.mbovis.org/>) da Universidade Complutense de Madri,
120 Espanha.

121121

122 **RESULTADO E DISCUSSÃO**

123123

124 Sessenta e três amostras oriundas de 17 bovinos e 46 bubalinos provenientes de animais com e sem
125 LST, porém dos mesmos rebanhos, foram isolados em meio de cultivo Stonebrink. 44 (69,8%) foram positivos
126 em cultura, destes, 13 (29,5%) eram de bovinos e 31 (70,5%) de bubalinos, demonstrando a alta prevalência de
127 tuberculose bovina, principalmente em rebanhos de bubalinos.

128 Na PCR, realizada nos 44 isolados em cultura, detectou-se 35 (79,5%) positivos para *M. bovis* em
129 quatro bovinos e 27 bubalinos no estado do Amazonas e quatro bovinos do Pará. Dos 35 isolados positivos para
130 *M. bovis*, apenas um isolado de bubalino, proveniente do Amazonas, não continha LST. Foi realizado PCR em
131 nove isolados em cultura que apresentaram crescimento inconclusivo por contaminação na cultura e detectou-se
132 seis cepas positivas para o complexo *M. tuberculosis*. O restante dos isolados foram considerados negativos.

133 A espoligotipagem foi realizada nos 35 isolados de *M. bovis* e seis tipos de espoligotipos foram
134 identificados: SB0822, SB0295, SB1869, SB0121, SB1800 e SB1608 (Tabela 1). Os seis tipos de espoligotipos
135 identificados neste estudo, foram comparados com os padrões contidos no banco de dados do *website*
136 (www.mbovis.org).

137 O espoligotipo SB0822 apesar de ser considerado pouco frequente, foi majoritariamente observado
138 neste estudo, presente nos municípios amazonenses de Careiro da Várzea em um bovino, Manacapuru em dois
139 bovinos, Urucará em seis bubalinos e em quatro bubalinos em Autazes/Comunidade Novo Céu, todos os treze
140 animais oriundo do estado do Amazonas continham LST. Já no estado do Pará, foram observados um bovino no
141 município de Alenquer e três no município de Prainha, todos com LST. Esse espoligotipo não havia sido descrito
142 no Brasil, porém foi descrito na França (www.mbovis.org), em bovinos na Espanha [16] e Portugal [17] e em
143 búfalos na Colômbia [18], sugerindo haver uma transmissão ativa da cepa entre os animais da região Amazônica
144 e do país vizinho.

145 Outros espoligotipos considerados pouco frequentes foram observados neste estudo como o SB1869,
146 que já havia sido descrito em São Paulo por Rocha [19], foi identificado neste estudo em cinco bubalinos
147 (14,3%) no estado do Amazonas, um em Itacoatiara e em quatro em Autazes/Comunidade Novo Céu (Tabela 1).
148 O espoligotipo SB1608, também considerado pouco frequente, foi descrito em animais silvestres em Portugal [6]

e não havia sido descrito anteriormente no Brasil, porém foi isolado em um bubalino no município de Parintins-AM e SB1800 descrito no Brasil (www.mbovis.org) e identificado em um bovino em Apuí - AM (Tabela 1).

O SB0295 foi o segundo espoligotipo mais frequente observado neste estudo, em nove bubalinos no Amazonas, sendo ele majoritariamente encontrado nos isolados do município de Parintins e observado em um dos isolados que não continha LST; no município de Urucará foi o único espoligotipo distinto encontrado no rebanho e identificado em cinco bubalinos em Autazes/Comunidade Novo Céu. Este espoligotipo é considerado o segundo mais frequente no Brasil [20], descrito no estado da Paraíba [21], Bahia [22], Mato Grosso, Goiás [23], Mato Grosso do Sul, Santa Catarina [24] e no estado de São Paulo [19], mas não foi descrito e nem identificado no estado do Pará, já fora do Brasil, foi descrito em búfalos na Argentina [20] e em alpacas (*Lama pacos*) [25] e javalis (*Sus scrofa*) na Espanha [26].

O espoligotipo SB0121 é considerado o mais prevalente em diversos estudos e o mais frequente no Brasil [20], foi observado em dois (5,7%) bubalinos no município de Autazes/Comunidade Novo Céu-AM, bem como já havia sido descrito em outros estudos, nos estados da Bahia [22], Paraíba [24], Mato Grosso, Mato Grosso do Sul [27], Goiás [23], Minas Gerais [24] e Rio Grande do Sul [28]. Fora do Brasil, SB0121 foi descrito na Colômbia [18], Argentina, Venezuela [20], México [29], Portugal [6] e França [30].

O município de Autazes/Comunidade Novo Céu, obteve o maior número de isolados estudados, todos bubalinos com LST, deteve de 42,8% (15/35) dos isolados positivos de *M. bovis*, dos quais apresentaram quatro espoligotipos distintos nos animais estudados, SB0295 (n=5), SB0822 (n=4), SB1869 (n=4), SB0121 (n=2), sugerindo a disseminação de genótipos distintos nessa região.

Os espoligotipos SB0822 e SB0295 foram juntos responsáveis por 74,3% das cepas isoladas na região Amazônica. SB1869, considerado não muito frequente, foi o terceiro espoligotipo mais observado neste estudo, com 14,3% dos isolados e contrário a outros estudos que descrevem o SB0121 como o majoritariamente encontrado, ele compreendeu de apenas 5,7% dos isolados estudados.

A espoligotipagem foi a opção de escolha para genotipagem neste estudo, pois após o crescimento dos isolados em cultura, essa técnica foi produzida em um curto período de tempo, demonstrando rapidez e facilidade, além de ofertar dados de diversas cepas de *M. bovis* em larga escala, confirmou o polimorfismo existente entre cepas da região Amazônica.

Neste estudo, foi possível observar uma alta diversidade genética dos isolados de *M. bovis* na região Amazônica, inclusive com a detecção de espoligotipos incomuns no Brasil. Também detectou-se espoligotipo encontrado na Colômbia, país fronteiro com a região Amazônica, bem como genótipos idênticos nos dois

179 estados, Pará e Amazonas. Estes fatos sugerem uma possível disseminação de genótipos de *M. bovis* por
 180 comércio/transporte de bovinos entre regiões.

181181

182 REFERÊNCIAS

- 183 1. Rodrigues RA (2017) Reações Falso-negativas ao Teste Cervical Comparativo para Tuberculose Bovina.
 184 Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
 185 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande – MS.
 186186
- 187 2. Dawson KL, Bell A, Kawakami RP, Coley K, Yates G, Collins DM (2012) Transmission of
 188 *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* Complex Species) from a Tuberculosis Patient to a Dairy Cow in
 189 New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*.
 190190
- 191 3. Etchechoury I, Valencia GE, Morcillo N, Sequeira MD, Imperiale B, López M, Caimi K, Zumárraga MJ,
 192 Cataldi A, Romano MI (2010) Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First
 193 Description of a Person-to-Person Transmission Case. *Zoonoses Public Health*.
 194194
- 195 4. Silva SCG, Alves ADF, Almeida TJO, Sá PCL, Souza Filho AF, Cárdenas NC, Ferreira Neto JS,
 196 Heineman MB, Azevedo SS, Torres MBAM (2018) Isolation and Identification of *Mycobacterium*
 197 *bovis* in Cattle Slaughtered from na Abattoir in Garanhuns, Pernambuco. *Semina: Ciências Agrárias*,
 198 Londrina.
 199 5. Corner LAL, Murphy D, Gormley E (2011) *Mycobacterium bovis* Infection in the Eurasian Badger
 200 (*Meles meles*): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. *J. Comp. Path.*
 201201
- 202 6. Reis ACL (2015) On the trail of *Mycobacterium bovis* subsp. *Paratuberculosis* and *Mycobacterium*
 203 *bovis* in mainland Portugal: a microbiological and molecular survey in wildlife. Dissertação de Mestrado
 204 em Biologia Molecular e Genética. Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências.
 205205
- 206 7. Smith RL, Tauer LW, Schukken YH, Lu Z, Grohn YT (2013) Minimization of bovine tuberculosis
 207 control costs in US dairy herds. *Preventive veterinary Medicine*.
 208208
- 209 8. Palmer MV (2013) *Mycobacterium bovis*: Characteristic of Wildlife Reservoir Hosts. *Transboundary*
 210 *and Emerging Diseases*.
 211211
- 212 9. Michel, A.L., Müller, B., van Helden, P.D., 2009. *Mycobacterium bovis* at the animalhuman interface: a
 213 problem, or not? *Veterinary Microbiology*.
 214214
- 215 10. Broughan, J.M., Downs, S.H., Crawshaw, T.R., Upton, P.A., Brewer, J., Clifton-Hadley, R.S., 2013.
 216 *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: review of
 217 epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. *The Veterinary Journal*.
 218218
- 219 11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa SDA Nº10,
 220 de 3 de março de 2017. Publicada no DOU Nº116, de 20 de junho de 2017, Seção 1, págs. 4-8. Acesso:
 221 02 de março de 2017. Disponível em: <
 222 http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSA/PECEBT/IN_SDA_10_2017_PNCEBT.pdf >
 223223
- 224 12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A,
 225 Monlhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J (1997) Simultaneous Detection and Strain
 226 Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol*.
 227227
- 228 13. Ramos DF, Silva ABS, Fagundes MQ, Von Groll A, da Silva PEA, Delagostin OA (2014) Molecular
 229 typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the South of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*.
 230230
- 231 14. de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P, Rieder H, Valenzula P, Weyer K
 232 (1998) Part I: Organization and Management. *Laboratory Services in Tuberculosis Control*:
 233 WHO/TB/98.258. P. 38-41
 234

15. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Monhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J (1997) Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. J Clin Microbiol.
16. Romero B, Arnaz A, Sandoval A, Álvarez J, De Juan L, Bezos J, Sánchez C, Galka M, Fernández P, Mateos A, Domínguez L (2008) Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National park revealed by genotype variation. Veterinary Microbiology.
17. Matos, F., Cunha, M.V., Canto, A., Albuquerque, T., Amado, A., Botelho, A., 2010. Snapshot of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* infections in livestock in a bovine tuberculosis low incidence scenario. Journal of Clinical Microbiology.
18. Jojoa-Jojoa J, Wintaco M, Osorio F, Puerto-Castro G, Guerreiro-Guerreiro M (2016) First approach to molecular epidemiology of bovine tuberculosis in Colombia. Ver. MVZ Córdoba.
19. Rocha VCF (2013) Avaliação do *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e *Multispacer Sequence Typing* na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis*. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
20. Zumárraga MJ, Arriaga C, Barandiaran S, Cobos-Marin L, de Waard J, Estrada-Garcia I, Figueiredo T, Figueroa A, Gimenez F, Gomes HM, Gonzalez YMJ, Macias A, Milian-Suazo F, Rodriguez CA, Santillan MA, Suffys PN, Trangoni MD, Zumárraga AM, Cataldi A (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. Research in Veterinary Science.
21. Higino SSS, Pinheiro SR, Souza GO, Dib CC, Rosário TR, Melville PA, Alves CJ, Azevedo, SS (2011) *Mycobacterium bovis* Infection on Goats From the Northeast Region of Brazil. Brazilian Journal of Microbiology.
22. Azamora Filho F, Vasconcellos SEG, Gomes HM, Cavalcante MP, Suffys PN, Costa JN (2014) Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. Pesq. Vet. Bras.
23. Carvalho RCT, Vasconcellos SEG, Issa MA, Soares Filho PM, Mota PMPC, Araújo FR, Carvalho ACS, Gomes HM, Suffys PN, Figueiredo EES, Paschoalin VMF (2016) Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* from Cattle Reared in Midwest Brazil. PLoS ONE.
24. Parreiras PM, Andrade GI, Nascimento TF, Oelemann MC, Gomes HM, Alencar AP, Assis RA, Mota PMPC, Pereira MAS, Lobato FCF, Lage AP, Suffys PN (2012) Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* from cattle in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.107(1): 64-73.
25. García-Bocanegra I, Barranco I, Rodríguez-Gómez M, Pérez, B, Gómez-Laguna J, Rodríguez S, Ruiz-Villamayor E, Perea A (2010) Tuberculosis in Alpacas (*Lama pacos*) Caused by *Mycobacterium bovis*. Journal of Clinical Microbiology.
26. García-Bocanegra I, Val BP, Arenas-Montes A, Paniagua J, Boadella M, Gortázar C, Arenas A (2012) Seroprevalence and Risk Factors Associated to *Mycobacterium bovis* in Wild Artiodactyl Species from Southern Spain, 2006-2010. PLoS ONE.
27. Cazola DO, Jorge KSG, Zumárraga MJ, Souza-Filho AF, Araújo FR, Osório ALAR (2015) Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras.
28. Ramos DF, Silva ABS, Fagundes MQ, Von Groll A, da Silva PEA, Delagostin OA (2014) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the South of Brazil. Brazilian Journal of Microbiology.

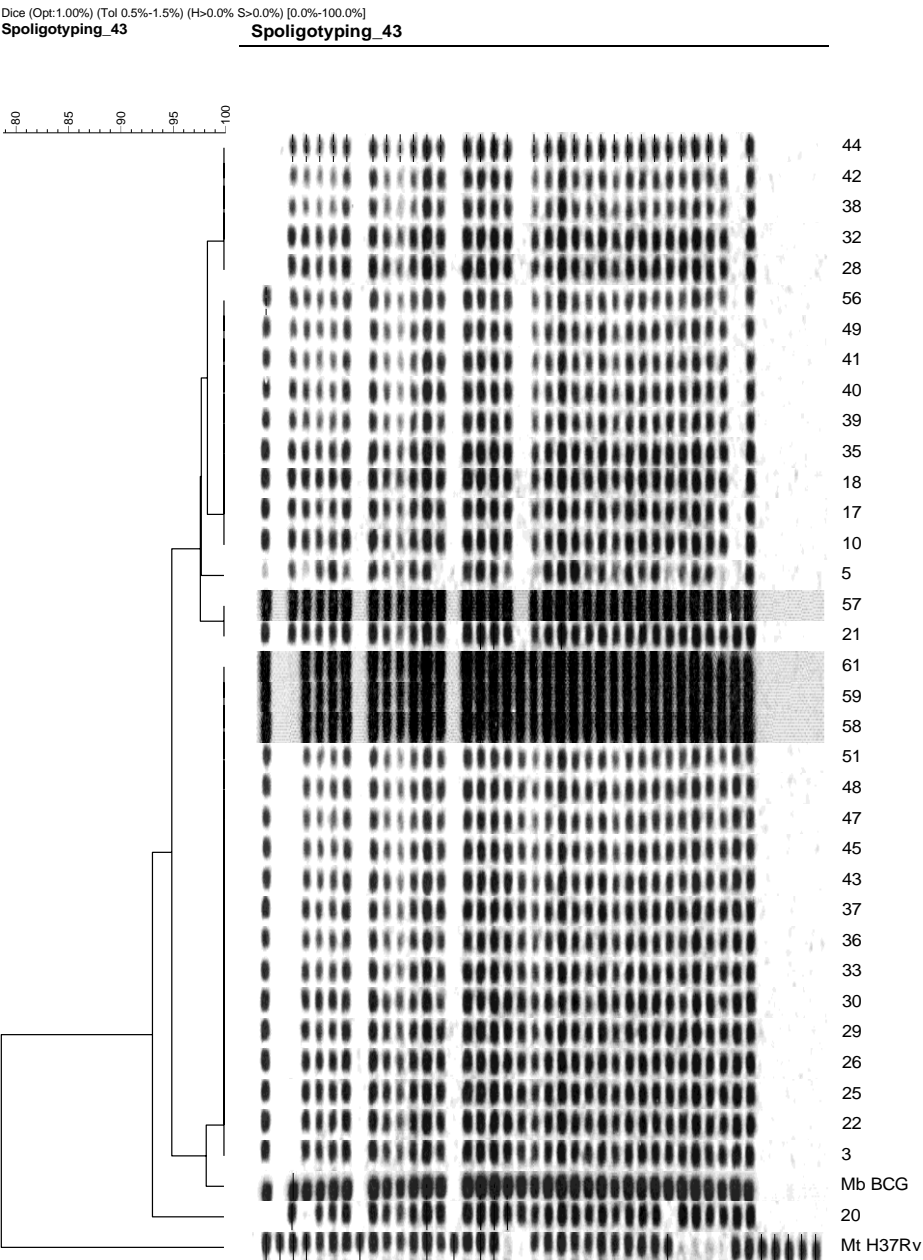
29. Reyes JAG, Casanova LG, Torres CR, Gallegos SLS, Alarcón GJC, Pezzat MM, Martínez OP, Chávez CE, Suazo FM (2012) Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. Preventive Veterinary Medicine.
30. Hauer A, Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henalt S, Bulach T, Bañuls A, Biet F, Boschirol ML (2015) Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. PLoS ONE.

Tabela 1: Distribuição dos 35 isolados de *M. bovis* da região Amazônica, de acordo com local de origem, espécie, isolamento em meio de cultura, PCR com Mb.400 e padrão de espoligotipo encontrado.

Amostra	Município/ Estado	Espécie	Lesão	Cultivo	PCR RD4	Espoligotipo
3	Alenquer – PA	Bovino	+	+	+	SB0822
22	Prainha – PA	Bovino	+	+	+	SB0822
48	Prainha – PA	Bovino	+	+	+	SB0822
51	Prainha – PA	Bovino	+	+	+	SB0822
20	Apuí - AM	Bovino	+	+	+	SB1800
36	Careiro da Várzea - AM	Bovino	+	+	+	SB0822
42	Itacoatiara – AM	Bubalino	+	+	+	SB1869
43	Manacapuru - AM	Bovino	+	+	+	SB0822
58	Manacapuru - AM	Bovino	+	+	+	SB0822
5	Parintins – AM	Bubalino	+	+	+	SB1608
10	Parintins – AM	Bubalino	-	+	+	SB0295
18	Parintins – AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
56	Parintins – AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
25	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
26	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
30	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
47	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
59	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
61	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
41	Urucará - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
21	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0121
57	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0121
29	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
33	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
37	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
45	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0822
28	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB1869
32	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB1869
38	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB1869
44	Autazes/CNC-AM	Bubalino	+	+	+	SB1869
17	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
35	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
39	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
40	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295
49	Autazes/CNC - AM	Bubalino	+	+	+	SB0295

Legenda: Autazes/CNC – AM: Autazes/Comunidade Novo Céu –Amazonas.

305 Figura 1: Dendrograma baseado nos resultados de *spoligotyping* dos 35 isolados de *M. bovis* da região
306 Amazônica do Brasil. Cepas Mt H37Rv de *M. tuberculosis* e Mb BCG de *M. bovis* foram utilizadas para
307 controles positivos.



308308

309309