

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

**Caracterização da diversidade genética de *Mycobacterium*  
*bovis* no estado do Rio Grande do Sul**

Autora: Bárbara Ortiz Mendes

Orientador: Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Agosto - 2018

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

**Caracterização da diversidade genética de *Mycobacterium bovis* no estado do Rio Grande do Sul**

Autora: Bárbara Ortiz Mendes

Orientador: Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

"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 Aplicada à Saúde Animal e Humana"

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Agosto – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco - UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

M538c Mendes, Bárbara Ortiz  
Caracterização da diversidade genética de Mycobacterium  
bovis no estado do Rio Grande do Sul / Bárbara Ortiz  
Mendes; orientador Flávio Ribeiro de Araújo  
56 f.: il.  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Católica Dom Bosco,  
Campo Grande, 2018  
Inclui bibliografia  
  
1. Mycobacterium bovis,. 2. Tuberculose bovina.  
3. Bovino - Doenças.I.Araújo, Flávio Ribeiro de. II.Título.

CDD: 636.2089

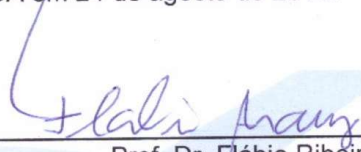
**Caracterização da Diversidade Genética de *Mycobacterium bovis* no  
Estado do Rio Grande do Sul**

Autora: Bárbara Ortiz Mendes

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia  
Área de concentração: Biotecnologia.

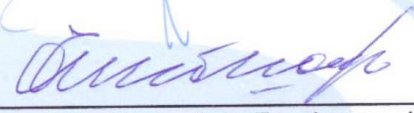
APROVADA em 24 de agosto de 2018.



Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo - UCDB



Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB



Prof. Dr. Martín Jose Zumárraga - INTA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida.

Aos meus avós, meus anjos da guarda, que me guiam e protegem a todo instante.

À minha mãe e porto seguro, por toda a dedicação, amor e orações constantes. E aos meus tios e primos, que apoiaram os meus passos, assistiram a minha luta e vivenciaram ao meu lado todas as etapas desse processo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, por me dar a oportunidade de desenvolvimento do projeto e, principalmente, por toda ajuda, confiança e paciência.

Ao Dr. Martín Zumárraga, que com muita paciência e dedicação dividiu o seu conhecimento.

Aos companheiros de jornada, Eduardo Faca, Jucélia Santos e Taynara Pasquatti, por muitas vezes terem sido minha motivação. E, Jimena Marfil, Jimena Ferrara e Ariel Nagel, por todos os ensinamentos, aprendizados e aventuras compartilhados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. À CAPES, pelo auxílio financeiro e bolsa concedida.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI/CNPQ/Universal (Processo: 443235/2014-7) e Embrapa (Código SEG: 02.13.10.008.00.00) pelo financiamento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Bárbara Ortiz Mendes, filha única de Jurema Cabral Ortiz e José Luiz Mendes de Castilho, nasceu em Campo Grande – MS, no dia 08 de abril de 1992.

Graduada em Zootecnia pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) no ano de 2015. Em 2017 ingressou como aluna regular no programa de mestrado *strictu sensu* em Biotecnologia, da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Possuindo como área de concentração a Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	4
2.1 Etiologia do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
2.2 Epidemiologia	5
2.3 Patogenia	7
2.4 Importância econômica da tuberculose bovina	8
2.5 Importância da tuberculose bovina como zoonose	9
2.6 Diagnóstico e controle da tuberculose bovina	11
2.6.1 Diagnóstico	12
2.7 Importância dos testes de genotipagem	16
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	20
<b>4. OBJETIVO</b>	21
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
5.1 Obtenção de material	22
5.2 Preparo e cultivo das amostras	23
5.3 Genotipagem das micobactérias – Espoligotipagem	25
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
<b>7. CONCLUSÕES</b>	31
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	32



## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Prevalência de tuberculose bovina em rebanhos nos estados do Brasil	2
<b>Figura 2</b>	Estrutura do locus DR no genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG que contém 48 e 41 DRs respectivamente, intercalados com espaçadores de DNA não repetitivos que variam de 35 a 41 pares de bases (pb) de comprimento. Com o princípio da amplificação <i>in vitro</i> da região DR por PCR	15
<b>Figura 3</b>	Padrões de hibridação (espoligotipos) de DNAs micobacterianos amplificados	16
<b>Figura 4</b>	Microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul, Brasil	23

## RESUMO

*Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é o agente causador da tuberculose em bovinos, enfermidade de alta relevância econômica e também influencia o comércio dos animais e de seus produtos, além de constituir-se uma zoonose. A genotipagem por espoligotipagem contribuiu para melhor compreensão acerca da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, proporcionando o aumento da eficiência dos programas de controle da doença. O Rio Grande do Sul possui elevada importância na produção brasileira e faz fronteira com outros países nos quais também há focos da enfermidade. Desta forma, a genotipagem de isolados de *M. bovis* deste estado dará maiores subsídios para o controle da bTB, acelerando a redução de sua prevalência e colaborando com futuras políticas de erradicação da enfermidade. Assim sendo, a proposta deste estudo baseou-se no isolamento, identificação e genotipagem de *M. bovis*, a partir de lesões sugestivas de tuberculose de bovinos advindos da microrregião de Lajeado-Estrela, RS. As amostras de tecido com lesões sugestivas de bTB foram processadas e cultivadas em meio Stonebrink, e as colônias com características compatíveis com *M. bovis* foram submetidas à extração de DNA e PCR. Após a espoligotipagem, os espaçadores foram visualizados por detecção de quimioluminescência e os padrões encontrados analisados comparando aos já descritos na base de dados. Os isolados apresentaram três diferentes agrupamentos e um apresentou perfil único, não identificado anteriormente: 32 isolados apresentaram o padrão SB0121, seis SB0295 e um isolado SB1683. Os resultados obtidos podem contribuir com estudos epidemiológicos, uma vez que detecta e caracteriza a variabilidade genética dos isolados.

Palavras chave: *Mycobacterium bovis*, espoligotipagem, tuberculose bovina, Rio Grande do Sul.

## ABSTRACT

*Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, is the causative agent of tuberculosis in cattle, a disease of great economic importance and also influences the trade of animals and their products, besides constituting a zoonosis. Molecular spoligotyping genotyping has contributed to a better understanding of the epidemiology of *M. bovis* infections, increasing the efficiency of disease control programs. Rio Grande do Sul has high importance in Brazilian production and is bordered by other countries in which there are also foci of the disease. Thus, the genotyping of *M. bovis* isolates from this state will provide greater subsidies for the control of bTB, accelerating the reduction of its prevalence and collaborating with future policies to eradicate the disease. Therefore, the proposal of this study was based on the isolation, identification and genotyping of *M. bovis*, from lesions suggestive of bovine tuberculosis coming from the micro region of Lajeado-Estrela, RS. Tissue samples with lesions suggestive of bTB were processed and cultured in Stonebrink medium, and colonies with *M. bovis* compatible characteristics were subjected to DNA extraction and PCR. After spoligotyping, the spacers were visualized by chemiluminescence detection and the patterns found were compared to those already described in the database. The isolates presented three different groupings and one presented a single profile, previously unidentified: 32 isolates presented SB0121, six SB0295 and one SB1683 isolate. The results obtained may contribute to epidemiological studies, as it detects and characterizes the genetic variability of the isolates.

Key words: *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, bovine tuberculosis, Rio Grande do Sul

## 1. INTRODUÇÃO

Classificada como zoonose, a tuberculose bovina (bTB) é uma doença infecciosa crônica causada por *Mycobacterium bovis* (SANABRIA et al., 2017), tem como hospedeiros principais, bovinos e bubalinos e apresenta efeito debilitante (ZUMÁRRAGA et al., 2012). É distribuída em todo o mundo e, de acordo com os cronogramas da doença disponíveis no Banco Mundial de Informações sobre Saúde Animal, 109 países relataram a presença de infecções por *M. bovis* (OIE, 2010). É considerada erradicada na maioria dos países desenvolvidos, devido às políticas de controle (PARREIRAS et al., 2012). De acordo com Zumárraga et al. (2013), a doença é endêmica na América Latina, portanto muitos países possuem programas de controle e erradicação. Porém, apesar do sucesso destes programas, relatos de surtos da doença continuam frequentes. Uma das razões pode estar relacionada à reintrodução de gado infectado em rebanhos, transmissão por animais selvagens ou uma falha na detecção de todos os animais infectados, que podem permanecer como reservatórios de bTB (RODRIGUES et al., 2017).

Ferreira Neto et al. (2016) apontam que, no Brasil, desde a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, em 2001, foi produzido um grande volume de dados epidemiológicos que permitem o avanço do país no combate às duas doenças, porém esse progresso tem sido limitado por conta da dificuldade de engajar as cadeias produtivas de carne e leite. Os mesmos autores apresentam estudos realizados em 13 unidades federativas, que incluem 75% do rebanho brasileiro, e destacam os estados de maior prevalência da bTB como sendo Espírito Santo, norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e sul de Goiás, que são regiões produtoras de leite (Figura 1).

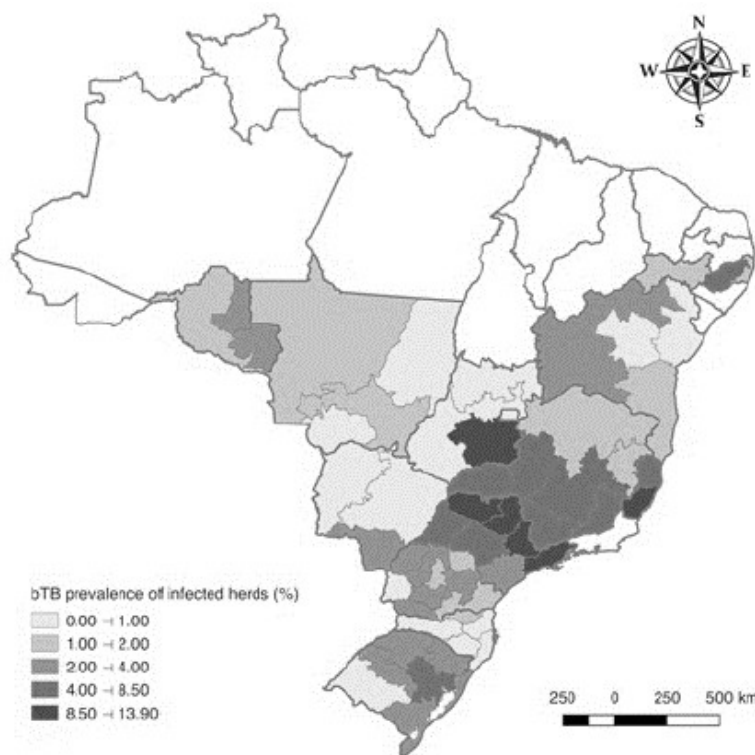


Figura 1: Prevalência de tuberculose bovina em rebanhos nos estados do Brasil.

Fonte: FERREIRA NETO et al., (2016).

Para evitar que a doença se instale na propriedade são necessárias medidas de higiene, como limpeza e desinfecção das instalações, ventilação e exposição solar, especialmente de bebedouros e cochos (ALMEIDA et al., 2017). Os rebanhos maiores possuem uma taxa de substituição mais alta, aumentando assim o risco de inserção de bovinos infectados no plantel. A compra de animais, em particular de fazendas de risco, tem importância primordial na transmissão de tuberculose bovina (RAMÍREZ-VILLAESCUSA et al., 2010; BESSELL et al., 2012).

A tuberculose bovina é uma patologia que, economicamente, possui potencial devastador. As perdas que acarreta estão relacionadas à redução produtiva, condenação de carcaças e/ou descarte precoce (HOMEM et al., 2016). Além do prejuízo econômico, a propriedade em que a doença foi detectada perde seu prestígio (BRASIL, 2006). A tuberculose bovina é uma zoonose que possui relação com a exposição ocupacional. A exposição à infecção por *M. bovis*, de acordo com Vayr et al. (2018), pode acometer veterinários e assistentes, trabalhadores de matadouro e trabalhadores em contato com a vida selvagem, no caso de caçadores e taxidermistas. Porém Olea-Popelka et al. (2017) apontam que a prevalência estimada

da tuberculose zoonótica permanece incerta pela dificuldade de distinção com a tuberculose causada por *M. tuberculosis*.

A técnica de espoligotipagem realiza detecção simultânea de diferentes cepas (RODRIGUEZ et al., 2004), apresentando-se como excelente opção para estudos de triagem em larga escala (ZUMÁRRAGA et al., 2013). Por combinar informações diagnosticadas rapidamente e dados de epidemiologia molecular, contribui para o entendimento de distribuição da doença e auxilia no desenvolvimento de estratégias de controle.

O Rio Grande do Sul é o estado mais meridional do Brasil e possui características ambientais e culturais que o distinguem do resto do país. O estado possui na pecuária o ponto forte de sua economia, contando com um efetivo de aproximadamente 14 milhões de cabeças (BRASIL, 2017). A bovinocultura apresenta grande importância econômica, histórica e cultural, sendo destinada principalmente à indústria de produtos alimentícios de origem animal, como carne, leite e derivados, assim como subprodutos (couro, vísceras, graxas) (SOUZA; SILVA et al., 2014). A mesorregião Noroeste é a mais especializada na produção de leite, já o rebanho bovino de corte está localizado mais ao sul, sendo mais numeroso na mesorregião Sudoeste (SCHUMACHER; MARION FILHO, 2013). Os mesmos autores apontam que, dentre as sete mesorregiões do Rio Grande do Sul, a pecuária de corte teve taxas de crescimento positivas na Sudoeste e Sudeste, as quais formam a região da campanha e fazem divisa com o Uruguai e, no caso da Sudoeste, também com a Argentina.

Pela importância da bovinocultura no Rio Grande do Sul, e por ser um estado que faz fronteira internacional com países nos quais a bTB também afeta os rebanhos, este estudo teve por objetivo caracterizar geneticamente *M. bovis* no estado do Rio Grande do Sul e destacar o polimorfismo entre seus genótipos, de modo a melhorar o entendimento acerca da distribuição da bTB no estado.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Etiologia do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose é uma doença causada por microrganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, que apresenta mais de 100 espécies descritas (ROCHA, 2009). As espécies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis* e *M. suricattae* formam o Complexo *M. tuberculosis*, grupo responsável pela maioria dos casos de tuberculose animal e humana (SKERMAN et al., 1980; van SOOLINGEN et al., 1997; ARANAZ et al., 1999; COUSINS et al., 2003; ALEXANDER et al., 2010; van INGEN et al., 2012; PARSONS et al., 2013).

*Mycobacterium bovis* é uma bactéria intracelular (RODRIGUES et al., 2017), caracterizado como bacilo delgado, microaerófilo, que não possui motilidade, esporos ou cápsulas e possui de 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura (ROCHA, 2009). A estrutura da parede celular das micobactérias é complexa, contendo alto conteúdo de proteínas, lipídios e carboidratos e, devido ao conteúdo lipídico, apresenta a condição de álcool-ácido resistência (BAAR) (STROHL et al., 2004). Desde que encontre condições favoráveis, este microrganismo pode sobreviver no meio ambiente por períodos de tempo acima de dois anos, além de apresentar resistência a diversos desinfetantes químicos, com exceção dos produtos que desnaturam proteínas como o fenol, formol e álcool (DUFFIELD & YOUNG, 1985; KICH et al., 2012).

## 2.2 Epidemiologia

Antes mesmo da presença de sinais clínicos, o agente pode ser eliminado pela respiração, corrimento nasal, leite, fezes, urina e outros fluidos corporais, dependendo do órgão afetado. A ingestão de leite contaminado é a principal via de transmissão para animais jovens e também para o homem; já a transmissão transplacentária é considerada muito rara ou inexistente nos bovinos (O'REILLY & DABORN, 1995), pode ocorrer ainda a inalação ou deglutição do líquido amniótico infectado, levando ao desenvolvimento doença pulmonar ou de lesões nos intestinos ou nos linfonodos mesentéricos, respectivamente (MURAKAMI et al., 2009). Para que haja infecção por meio da via oral, a quantidade de bacilos existente precisa ser muito maior (cerca de 10-20 milhões de bacilos), do que a requerida para via aerossol, na qual são necessários apenas 1 a 5 bacilos para causar a infecção (ALMEIDA et al., 2017).

A combinação do isolamento micobacteriano em meio de cultura, a partir de tecidos bovinos, com a identificação e genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, proporcionando maior eficiência nos programas de controle da enfermidade (CAZOLA et al., 2015). As técnicas de tipagem molecular ajudam a estratificar e refinar os dados, fornecendo informações que facilitam a ação epidemiológica, incluindo vigilância de doenças e estudos de surtos. Isso permite a identificação de padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente díspares, bem como a identificação de rebanhos infectados por mais de uma cepa (SOUZA-FILHO et al., 2016).

Almeida et al. (1997) relataram 1,33% de animais positivos nos municípios de Guaíba e Eldorado do Sul. Segundo Abrahão (2005), entre 1973 e 1975 ocorreu um surto da doença em um rebanho de gado de corte constituído por 1.832 animais, em criação extensiva, e provenientes de uma propriedade rural do Município de São Vicente do Sul, no qual 36,6% dos bovinos eram positivos. Poletto et al. (2004) realizaram o teste de tuberculina em fazendas leiteiras de Passo Fundo e estimaram uma prevalência de 3,84% nos rebanhos e de 1,51% nos animais adultos. Lucena et al. (2010) revisaram os relatórios de necropsia e os resultados do exame histopatológico realizado em 6.706 bovinos entre 1964 e 2008 e relataram 16,7% das lesões compatíveis com a tuberculose.

No período de 2005 a 2010, a ocorrência de tuberculose bovina nos animais abatidos totalizou 0,2% dos casos (MAZZUTTI et al., 2011). Um estudo sobre a ocorrência da bTB em 28 municípios da região do Alto Uruguai-RS, caracterizadas por sua produção leiteira, observou 52 animais reativos à tuberculina (1,04%) distribuídos em 0,34% das fazendas da região, sendo os municípios com maiores ocorrências: Severiano de Almeida, Erebangó e Erechim, correspondendo a 0,97%, 0,49% e 0,47%, respectivamente (MARTINS; MAROSO, 2012).

Queiroz et al. (2016) estimaram a prevalência de rebanhos infectados por *M. bovis* em 2,8% e os resultados indicaram uma maior concentração de rebanhos infectados nas regiões ao norte do estado, as quais têm criações mistas entre corte e leite ou propriedades que possuem como atividade principal a produção leiteira. Em comparação com dados anteriormente pesquisados, o resultado foi estatisticamente igual aos estados da Bahia, Pernambuco, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rondônia, Goiás e Distrito Federal, inferiores aos dos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo.

Devido à maior aglomeração de animais durante a ordenha, os rebanhos leiteiros são mais vulneráveis à enfermidade (HUMBLET et al., 2009), assim como os rebanhos mistos. O risco de transmissão é maior, uma vez que aumenta a densidade populacional e o contato dos animais com o agente infeccioso (ALVAREZ et al., 2012). Além disso, os animais criados em fazendas leiteiras tendem a ser mais velhos que os animais dos rebanhos de corte, elevando a probabilidade de exposição ao bacilo (FERREIRA NETO et al., 2016). Os mesmos autores apontam que rebanhos com modos de produção mais sofisticados tendem a ser mais densos e seus animais mais estressados, favorecendo a transmissão da bTB.

Poletto et al. (2004) apontam a variação nos resultados entre as regiões como causa de fatores como manejo, testes realizados em cada propriedade e, principalmente, a fonte de aquisição dos animais, que pode ser de áreas de risco, movimentando animais contaminados entre as regiões (CAZOLA et al., 2015).

Na Argentina, a tuberculose bovina acomete aproximadamente 5% dos animais, particularmente o gado leiteiro (ZUMÁRRAGA et al., 2015) e a taxa de condenação de carcaças exibindo lesões compatíveis à bTB caiu de 6,7% para 0,7% entre 1969-2011 (SHIMIZU et al., 2014;). A última triagem nacional para reatores purificados de

proteína derivada (PPD) foi realizada em 1972, portanto, a prevalência atual de reatores de PPD é desconhecida (SHIMIZU et al., 2014). Uma atualização dos programas de bTB nos países da América Latina e Caribe, apontou uma prevalência de 0,7% (0 a 2,8%) em 10 distritos do Paraguai (SANABRIA et al., 2017). O Chile é dividido em duas zonas: a zona de controle no Norte com 13,7% de prevalência e a zona de erradicação no Sul com 0,34% de prevalência (ZUMÁRRAGA et al., 2013).

## 2.3 Patogenia

O bacilo possui amplo espectro de patogenicidade (SOUZA-FILHO et al., 2016) em relação a espécies domésticas, como cães, gatos, cabras, ovelhas e porcos (BROUGHAN et al., 2013) e silvestres, como búfalos, cervos e texugos (PALMER, 2013). Nos animais a forma clínica da tuberculose depende da rota de infecção do bacilo. Grande parte das infecções ocorre pela via respiratória, por meio da inalação de aerossóis contaminados (LEONARDI, 2013). Sua propagação independe de raça, sexo ou idade do hospedeiro (LOPES FILHO, 2010) e os animais enfermos são a principal fonte de infecção para o rebanho.

Nos animais, a forma clínica da tuberculose é dependente de sua rota de infecção, sendo a via respiratória a mais comum. Quando a infecção se dá pelo trato respiratório, o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais. Já quando a infecção é pela via digestiva, a lesão se dá principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. No entanto, pode atingir praticamente todos os órgãos quando há generalização do processo (RODRIGUES et al., 2008).

A infecção ocorre por meio da inalação de aerossóis, que chegam até os espaços alveolares dos pulmões, local onde serão fagocitados pelas células atuantes no sistema imunológico (ALMEIDA et al., 2017). Ao atingir o alvéolo, o bacilo é capturado por macrófagos, e o seu destino determinado pelos fatores virulência do microrganismo, carga infectante e resistência do hospedeiro. Caso o organismo não consiga destruir os bacilos, estes irão multiplicar-se no interior dos macrófagos. Quando cessa essa multiplicação, cerca de 2 a 3 semanas após o contato com o agente infeccioso, ocorre a resposta imune mediada por células e reação de hipersensibilidade tardia (RODRIGUES et al., 2008). Murakami et al. (2009)

apresentam que o sucesso da eliminação das micobactérias depende das atividades bactericidas dos macrófagos infectados. Quando os macrófagos infectados morrem, os bacilos liberados são novamente fagocitados por macrófagos adjacentes e essa habilidade dos macrófagos em inativar as micobactérias somente é melhorada após o desenvolvimento de uma hipersensibilidade tardia, acionada pelos antígenos bacterianos.

Nessa fase, o hospedeiro destrói seus próprios tecidos por meio da necrose de caseificação, para conter o crescimento intracelular das micobactérias. Com mediação dos linfócitos T, ocorre a migração de novas células de defesa, culminando com a formação de granulomas. Os bacilos da lesão tuberculosa propagam-se ao linfonodo satélite, onde desencadeiam a formação de novo granuloma, constituindo o complexo primário (RODRIGUES et al., 2008).

A resposta imune dos bovinos durante a infecção por *M. bovis* é complexa e dinâmica, envolvendo uma variedade de eventos celulares, resultando em apresentações clínicas e patológicas marcadamente diferenciadas de forma individual nos animais (NEILL et al., 2001). Os efeitos da resposta imune específica resultam em lesões variando desde infecções autolimitantes até doença sistêmica grave.

## **2.4 Importância econômica da tuberculose bovina**

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, concentrando-se principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em bovinos leiteiros. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o efetivo brasileiro de bovinos, no ano de 2016, foi de 218,23 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,4% em comparação com o ano anterior (BRASIL, 2017).

Para os pecuaristas, a patologia gera consequências financeiras desastrosas. A importância econômica atribuída à doença está baseada nas perdas resultantes do sacrifício de animais, da queda no ganho de peso, da diminuição da produção de leite, do descarte precoce, muitas vezes de animais de alto valor zootécnico e da

condenação de carcaças no abate. (HOMEM et al., 2016). Além disso, a enfermidade é uma barreira comercial para a exportação de carne bovina brasileira (MAPA, 2017).

A introdução e a manutenção da patologia no plantel são influenciadas por características como tipo de exploração, densidade populacional e práticas zootécnicas e sanitárias de cada unidade de criação. Conforme apresentado no Manual Técnico do PNCEBT, a tuberculose, por não apresentar sinais clínicos alarmantes, como o aborto, não recebe a devida atenção de criadores e autoridades sanitárias. Desta maneira, a prevalência no rebanho se eleva, até que o pecuarista seja alertado sobre a enfermidade (BRASIL, 2006).

## **2.5 Importância da tuberculose bovina como zoonose**

A tuberculose bovina possui elevada importância devido aos prejuízos econômicos que acarreta, além de promover preocupação com a saúde pública, uma vez que é zoonose diretamente relacionada aos profissionais que mantêm contato com animais (MARTINS; MAROSO, 2012).

Em áreas endêmicas, onde a bTB e a tuberculose humana coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante no monitoramento da dispersão de *M. bovis* entre os bovinos e consequentemente para os seres humanos (MURAKAMI et al., 2009). A infecção humana por *M. bovis* representa uma pequena proporção (0,5 a 7,2%) de todos os pacientes com diagnóstico confirmado bacteriologicamente de tuberculose (de la RUA-DOMENECH, 2006). Conforme afirmam Almeida et al. (2017), os casos em humanos ocorrem devido ao crescimento populacional de bovinos, fatores como condições climáticas, educacionais, institucionais, populacionais e precarização das atividades agropecuárias, favorecendo a zoonose como fonte de infecção das populações animais e humanas.

A patogênese da bTB não é tão bem entendida quanto a apresentada pela doença humana. Em relação àquela causada por *M. bovis* em seres humanos, ela é clínica e patologicamente indistinguível da doença causada por *M. tuberculosis* (de la RUA-DOMENECH, 2006). A tuberculose humana é causada principalmente por *M. tuberculosis*, mas a infecção por *M. bovis* foi relatada e representa um problema de saúde pública (COSIVI et al., 1998; SMITH et al., 2006). A tuberculose humana

causada por *M. bovis* está associada à exposição ocupacional, inalação de aerossóis e contato com carcaças. Estes grupos que trabalham com bovinos infectados podem desenvolver a doença mais provavelmente na forma pulmonar (ALMEIDA et al., 2017). Outra rota de infecção é a via digestiva, devido à ingestão de leite contaminado (ROXO, 1997). A incidência varia de forma regional, dependendo principalmente da prevalência de rebanhos infectados e da aplicação de medidas preventivas (QUEIROZ et al., 2016).

O bacilo da tuberculose tem como característica alta resistência e, com isso, permanece viável em estábulo cerca de dois anos, até um ano na água e dez meses em produtos contaminados de origem animal (BIANCHINI; RODRIGUES, 2008). A maioria dos produtores do Brasil se encontra em propriedades de pequeno e médio porte e realiza tarefas de manejo, produção, abate, consumo e comercialização de produtos de maneira familiar fazendo com que a exposição ao agente transmissor se torne eminente. Müller et al. (2013) apontam que as taxas de incidência da zoonose são geralmente baixas a nível mundial, mas os dados disponíveis geram crescente preocupação com as consequências dessa doença em alguns grupos populacionais e ambientes.

Em um hospital de Buenos Aires, um estudo realizado por Cordova et al. (2012) encontrou elevados níveis (93%) de exposições zoonóticas típicas para *M. bovis* entre pacientes diagnosticados com bTB, destacando a exposição ocupacional (65%), histórico de vida em áreas rurais (31%) e consumo de leite cru (4%). Silva et al. (2018) realizaram estudos com 189 pacientes de Juiz de Fora (MG), sendo 97,4% moradores de área urbana, e encontraram 98,4% (186) infectados apenas por *M. tuberculosis* e 1,6% (3) infectados por *M. bovis* além de *M. tuberculosis*, destacando também a exposição ocupacional e consumo de lácteos não pasteurizados.

No entanto, bovinos não são a única fonte de *M. bovis*. Seres humanos têm sido infectados por contato com outras espécies animais e até mesmo humanos com tuberculose ativa, devida à *M. bovis*, podem infectar novamente os bovinos em contato próximo, pela via respiratória (GRANGE et al., 2001). Zumárraga et al. (2012) relataram a primeira transmissão de *M. bovis* multi-droga-resistente entre humanos na Argentina e demonstram a importância da aplicação de estratégias moleculares para identificar pacientes infectados com *M. bovis*, especialmente em regiões com alta prevalência de bTB.

Devido à similaridade entre *M.bovis* e *M. tuberculosis* na apresentação clínica, tratamento e prognóstico da infecção no homem, falhas na tentativa de diferenciação entre estas micobactérias pelos laboratórios são comuns. A distinção errônea desses bacilos induz a falsa impressão de que medidas de controle para os bovinos foram suficientes para se considerar a doença humana por *M. bovis* quase extinta em muitos países desenvolvidos (NEGRI FILHO et al., 2014).

## **2.6 Diagnóstico e controle da tuberculose bovina**

Para a elaboração de estratégias de controle e erradicação da doença, é fundamental haver o conhecimento da frequência das doenças, dos fatores que condicionam sua presença e possibilitam sua difusão (MARTINS; MAROSO, 2012).

Como forma de controlar a tuberculose bovina, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001 e atualizou em 2017, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), que em seu Regulamento Técnico apresenta diretrizes para reduzir a incidência da tuberculose (BRASIL, 2017). Como o nome indica, o programa objetiva diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde comunitária e promover a competitividade da pecuária nacional (ABRAHÃO et al., 2005), além de visar o envolvimento do setor produtivo e suas comunidades, o setor industrial e os consumidores e os médicos veterinários que fazem parte do setor privado. Suas normas e procedimentos de controle da tuberculose, do Programa, estão regulamentados em nível nacional (BRASIL, 2001).

Em vários países, os programas de controle da bTB envolvem a detecção e o descarte de animais infectados com base no teste intradérmico, que mede a reação de hipersensibilidade tardia provocada pela inoculação do antígeno micobacteriano (PPD) (RODRIGUES et al., 2017). Medidas de controle da bTB, baseadas na vigilância em matadouros, política de teste e abate e notificação de doenças foram intensificadas nas últimas décadas nos países da América do Sul, notadamente na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai (SILVA et al., 2018). As maneiras específicas de controle baseiam-se em medidas educativas de informar a população, buscar o diagnóstico precoce e tratamento adequado. Em áreas rurais, deve ser feito controle

sanitário dos rebanhos com eliminação do gado contaminado e aqueles tuberculina-positivos, além da fiscalização sanitária de produtos, garantindo principalmente a pasteurização (BRASIL, 2006). A erradicação de *M. bovis* no gado e a pasteurização de produtos lácteos são os pilares da prevenção da tuberculose zoonótica (SILVA et al., 2018).

### 2.6.1 Diagnóstico

O diagnóstico da patologia pode ser realizado de maneira direta ou indireta. A forma direta está baseada na detecção e identificação do agente etiológico no material biológico, que pode ser por microscopia direta (baciloscopia de tecidos) para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e coloração de Ziehl-Neelsen (CORRÊA, 2011) ou isolamento em meios de cultura (BERG et al., 2009), sendo este último recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal como método padrão ouro de identificação (OIE, 2009). O diagnóstico indireto é realizado por meio de resposta imune do hospedeiro, podendo ser humoral, quando há produção de anticorpos circulantes, ou celular, medida por células de defesa do organismo.

O teste tuberculínico é uma resposta de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos T sensibilizados, em indivíduos previamente expostos ao bacilo tuberculoso. É feito a partir de cultivos antigênicos de *Mycobacterium* sp. purificados ou PPD (*Purified Protein Derivative*) e para sua realização são necessários PPD bovino e/ou PPD aviário, conforme o teste a ser realizado (ANDREWS et al., 2008; BRASIL, 2017). Conforme preconizado pelo PNCEBT, a inoculação deve ser intradérmica em bovinos com idade igual ou superior a seis semanas e em três diferentes modalidades:

- O Teste da Prega Caudal (TPC): empregado somente no gado de corte e desde que o animal não seja destinado à reprodução. Neste, a PPD bovina será inoculada na dosagem de 0,1 mL, seis a dez centímetros da base da cauda. Os animais reagentes poderão ser submetidos a Teste Cervical Comparativo, com o intuito de ser confirmatório.
- O Teste Cervical Simples (TCS): realizado no gado leiteiro com inoculação de 0,1 mL de PPD bovina na região cervical ou escapular. Animais que

apresentarem diagnóstico inconclusivo ou positivo poderão ser submetidos novamente ao Teste Cervical Comparativo.

- O Teste Cervical Comparativo (TCC): no qual há aplicação simultânea de PPD bovino e aviário, na dosagem de 0,1 mL, na região cervical ou escapular de posição cranial para PPD aviário e caudal o PPD bovino. Este teste pode ser utilizado como teste de rotina ou teste confirmatório em animais reagentes aos dois testes anteriores. Animais inconclusivos ao teste poderão ser submetidos a um segundo teste cervical comparativo (BRASIL, 2017).

Após 72 horas, os animais positivos apresentarão edemas progressivos, devendo então ser descartado. Animais reagentes positivos deverão ser isolados do rebanho, afastados da produção leiteira e abatidos em estabelecimentos sob serviço de inspeção oficial e, no caso de impossibilidade do abate sanitário os animais serão submetidos à eutanásia na propriedade (BRASIL, 2017). O diagnóstico da tuberculose pela tuberculinização intradérmica tem representado um papel fundamental em programas de erradicação (MURAKAMI et al., 2009; OIE, 2009).

Além destes métodos amplamente utilizados, os constantes avanços da biologia molecular e conhecimentos sobre a imunidade contra as micobactérias promoveram a descoberta de novos diagnósticos. Dentre estes estão as técnicas de biologia molecular, tais como PCR, RFLP e espoligotipagem (KICH et al., 2012).

### **2.6.1.1 Métodos moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina**

#### **2.6.1.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica, desenvolvida pelo químico americano Kary Mullis no ano de 1983 (OLIVEIRA, 2010), possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, possui alta sensibilidade e especificidade, apresenta facilidade na execução e a possibilidade de amplificação simultânea do fragmento *in vitro* (MAPA, 2007; ROSÁRIO et al., 2014).

A PCR é considerada como uma opção atrativa para estudos epidemiológicos e caracterização de microrganismos causadores de doenças (MAPA, 2007). Em poucas

horas podem ser amplificadas pequenas quantidades de material genético, o que revolucionou várias áreas, tais como a biologia molecular e a patologia (OLIVEIRA, 2010). Porém, além de ser uma alternativa de diagnóstico rápida e específica para os métodos diretos, é uma técnica muito sensível (ROSÁRIO et al., 2014).

#### **2.6.1.1.2 Espoligotipagem**

Método desenvolvido por Kamerbeek et al. (1997), utiliza a PCR para amplificar sequências conservadas e conhecidas de DNA em um locus cromossômico particular, onde estão localizadas inúmeras regiões de repetição direta (DR), exclusivo no genoma de micobactérias do CMT, para detectar a presença ou ausência de espaçadores (Figura 2) (KAMERBEEK et al., 1997; CAZOLA et al., 2015).

Apresenta-se como uma técnica rápida, de simples desenvolvimento e de alta sensibilidade, detectando e diferenciando simultaneamente as cepas, permitindo aumentar o entendimento da disseminação da doença (KAMERBEEK et al., 1997).

A partir da amplificação da região DR de uma determinada cepa, a espoligotipagem (do inglês *spoligotyping*) detecta a presença ou ausência dos espaçadores de sequência conhecida, que por meio dos iniciadores utilizados na sequência DR, amplifica os espaçadores entre os alvos (Figura 3) (KAMERBEEK et al., 1997). A detecção é feita pela hibridação dos espaçadores em uma membrana, usando *miniblotter*.

Para cada subespécie alguns espaçadores estão sempre ausentes, o que permite sua diferenciação. No caso de *M. bovis*, os espaçadores ausentes são 3, 9, 16 e 39-43 (KAMERBEEK et al., 1997).

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

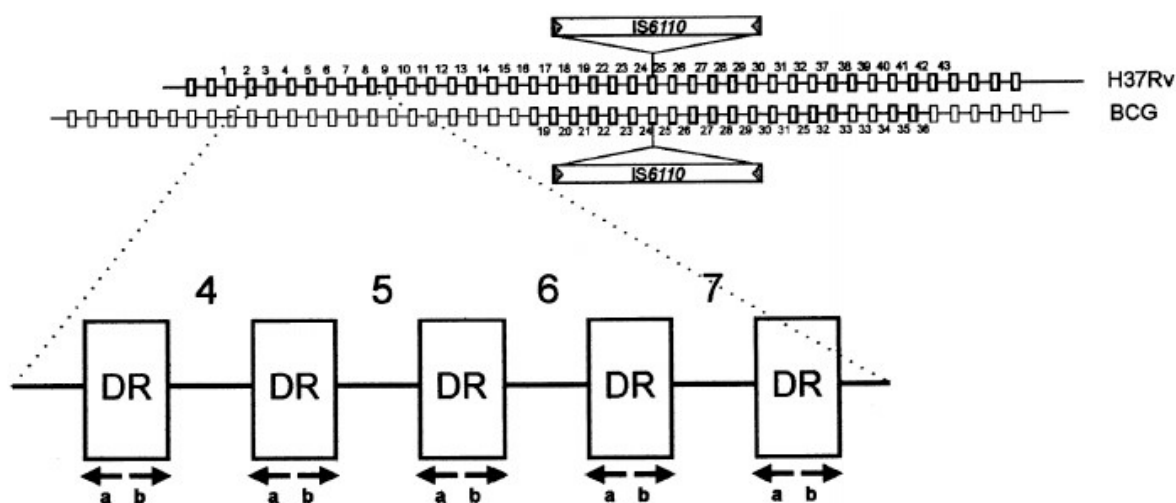


Figura 2: Estrutura do locus DR no genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e *Mycobacterium bovis* BCG que contém 48 e 41 DRs respectivamente, intercalados com espaçadores de DNA não repetitivos que variam de 35 a 41 pares de bases (pb) de comprimento. Fonte: KAMERBEEK et al. (1997).

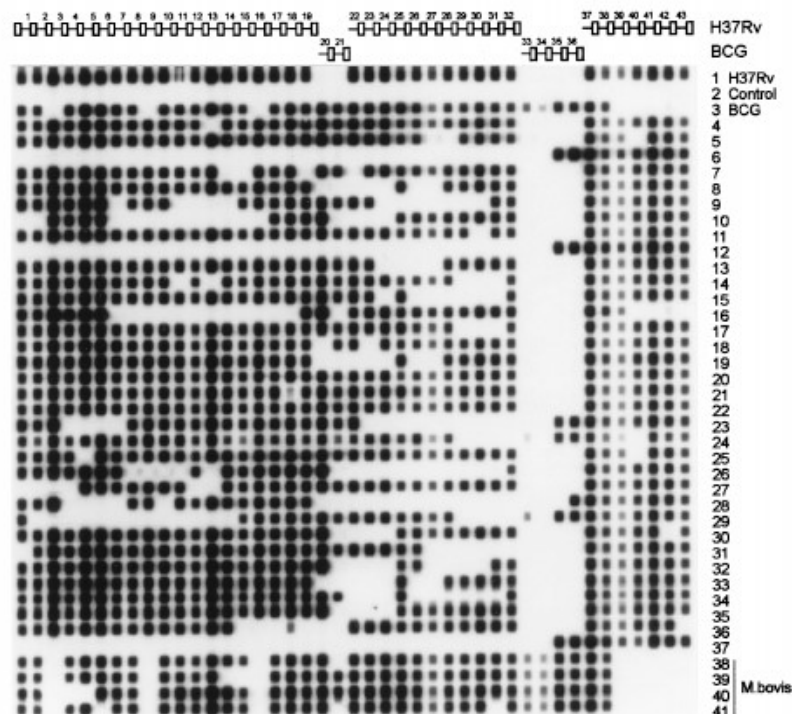


Figura 3: Padrões de hibridação (espigotipos) de DNAs micobacterianos amplificados. Fonte: KAMERBEEK et al. (1997).

## 2.7 Importância dos testes de genotipagem

O avanço da biologia molecular, juntamente com a globalização da economia e a pressão de mercados importadores acerca de um diagnóstico definitivo para os animais com lesões sugestivas à bTB estimulou o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular para o conhecimento da patologia (ARAÚJO et al., 2014; PATANÉ et al., 2017). As técnicas de tipagem molecular ajudam a estratificar e refinar os dados, fornecendo informações que facilitam a ação epidemiológica, incluindo vigilância de doenças e estudos de surtos (SOUZA-FILHO et al., 2016). Métodos como espoligotipagem, Unidades Repetitivas Intercaladas Micobacterianas em Repetição em Tandem do Número Variável (MIRU-VNTR) e Sequências Exatas em Tandem (ETR) auxiliam na identificação e discriminação das espécies, possibilitando estudos epidemiológicos (ROCHA, 2009).

As espécies do Complexo *M. tuberculosis* são genomicamente muito similares, com mais de 99,9% de identidade entre seus nucleotídeos (BROSCH et al., 2002; THOEN et al., 2006), diferindo entre si quanto à epidemiologia. Em razão da proximidade genética das subespécies do complexo, existe um grau de polimorfismo de DNA associado ao DNA repetitivo como: sequência de inserção (IS) e sequências curtas de DNA repetitivo (DR) (BASSO, 2006). Pandolfi et al. (2007) explicam que estas espécies possuem uma sequência de inserção exclusiva em seu cromossomo identificada como IS6110, de 1.355 pares de base.

Embora as culturas bacteriológicas sejam um método confiável e definitivo para detectar CMT, elas requerem uma quantidade significativa de tempo (até 90 dias) porque os membros desse complexo crescem lentamente quando comparados aos padrões bacteriológicos gerais (ARAÚJO et al., 2014).

Kich et al. (2012) desenvolveram um estudo sobre a presença de *M. bovis* em amostras de leite bovino *in natura* na região do Vale do Taquari e constataram que os métodos moleculares são uma excelente alternativa para a redução do tempo necessário para a identificação da *M. bovis*. Os autores relatam a PCR como uma metodologia de alta especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades muito pequenas de bacilos vivos ou mortos na amostra. A técnica da reação em cadeia da polimerase consiste na reprodução, *in vitro*, do processo de

duplicação do DNA (ácido desoxirribonucleico), de forma a obter-se quantidades consideráveis do DNA de interesse, sendo possível a sua identificação. É considerada uma ferramenta útil na caracterização epidemiológica de animais infectados em áreas consideradas de alto risco de transmissão de *M. bovis* (KICH et al., 2012). A aplicação da PCR utiliza baixa quantidade de DNA como alvo para tipagem e é de fácil execução, possui menor custo e possibilita o uso de espécimes clínicos diversos (FURLANETO et al., 2013)

O estudo molecular utiliza técnicas como Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP), Tipagem de Oligonucleotídeos Espaçadores (*Spoligotyping*) e Unidade Repetitiva Intercalada Micobacteriana (MIRU). O emprego destes métodos revolucionou a compreensão acerca da patologia (MALASPINA, 2009).

O método de tipagem denominado Unidade Repetitiva Intercalada Micobacteriana (MIRU) é rápido e reprodutível, permitindo a geração de genótipos baseados no estudo de locus com repetições tandem numéricas variáveis (VNTRs) do CMT. O método compara as linhagens em diferentes áreas geográficas, possibilitando o rastreamento da disseminação, possibilitando a análise de um grande número de amostras e a identificação de focos de disseminação dentro de uma população. Isso fornece dados para o controle da doença (SOUZA-FILHO et al., 2016). Os mesmos autores, ao estudarem os perfis genéticos de *M. bovis*, afirmam que a aplicação da técnica de epidemiologia molecular MIRU-VNTR a isolados obtidos de um rebanho infectado com bTB no estado do Rio Grande do Sul demonstra a diversidade genética entre as cepas em circulação e também apontam que a presença de diferentes genótipos no mesmo rebanho pode ter a influência de animais de estimação ou de diferentes fontes de infecção intrarrebanho.

Dentre as técnicas de genotipagem descritas, a RFLP utiliza o elemento de inserção IS6110 para análise de polimorfismo (BASSO, 2006) e, de acordo com Borges et al. (2004), é o método de genotipagem amplamente utilizado para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. Apesar da padronização, os perfis de RFLP são difíceis de comparar entre os laboratórios, dificultando os estudos globais de base populacional, além de a variabilidade genética do bacilo ser crescente, indicando a necessidade de outra metodologia (SOLA et al., 2003). Assim sendo, para

complementar a RFLP, surge a espoligotipagem, técnica desenvolvida por Kamerbeek et al. (1997).

A espoligotipagem é uma metodologia fundamentada na amplificação por PCR de uma região de repetições diretas polimórficas (*Direct Repeat* - DR), em um locus cromossômico particular, que está presente de forma exclusiva nas bactérias do CMT (KAMERBEEK et al., 1997). O genótipo resultante possui um formato binário simples, que favoreceu a construção de bancos de dados com a finalidade de facilitar o reconhecimento da origem de um determinado isolado clínico (SOLA et al., 2003; STREICHER et al., 2007).

Conforme apontam Zumárraga et al. (2013), as lesões identificadas no abate são enviadas para análise microbiológica e, em alguns casos, a técnica de espoligotipagem é solicitada, de maneira a conhecer a epidemiologia do CMT. A detecção dos genótipos em determinada localização geográfica fornece informações sobre a dinâmica de transmissão do CMT e, dessa forma, contribui para elaboração de estratégias para o controle da tuberculose (BASSO, 2006; PANDOLFI et al., 2007). A possibilidade de caracterização genética e demográfica colaborou com o melhor entendimento sobre a distribuição da doença, o esclarecimento das transmissões e das contaminações cruzadas (FURLANETO et al., 2013).

Zumárraga et al. (2013) realizaram um levantamento sobre a diversidade de espoligotipos de *M. bovis* na América Latina e concluíram que existem agrupamentos ou *clusters* encontrados em diferentes regiões geográficas. O espoligotipo SB0140, por exemplo, identificado na Argentina e Chile, é comumente encontrado na Irlanda, Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália. Já SB0121 é referenciado no Brasil e México e o SB1862 encontra-se mais frequentemente na Venezuela. Esses dados colhidos sugerem importação de animais entre os países que possuem igualdade de *clusters*, sem que houvesse controle sanitário dos mesmos.

Rocha (2009) analisou 116 isolados de *M. bovis* provenientes de focos de tuberculose bovina no estado de São Paulo e encontrou como espoligotipo majoritário o SB0295, seguido pelo SB0121. Em menores proporções apareceram SB0120, SB0140 e SB0881. Silva et al. (2010) realizaram espoligotipagem em lesões pulmonares e de linfonodos mediastínicos de 43 animais abatidos na região metropolitana de Salvador e encontraram os espoligotipos SB1055, SB0120 e

SB0268. Cazola et al. (2015) por meio de avaliação de tecidos com lesões sugestivas a tuberculose de 13 bovinos, observaram uma diversidade genética entre os espoligotipos encontrados em diferentes municípios de Mato Grosso do Sul e identificaram os espoligotipos SB0121, SB1145, SB0881 e SB0140.

Parreiras et al. (2012) realizaram espoligotipagem em 61 isolados de amostras de tecido de bovinos com lesões sugestivas de bTB coletadas pós abate e os espoligotipos mais frequentemente observados foram SB0295 e SB0121, seguidos por outros 15 espoligotipos (SB0120, SB0881, SB0274, SB1802, SB0134, SB1055, SB1145, SB1806, SB0332, SB1803, SB1033, SB0337, SB0267, SB0484 e SB1136). Os autores observaram os padrões de espoligotipos mais frequentes sendo semelhantes aos da linhagem BCG (SB0120), diferindo apenas da linhagem original pela perda do espaçador 21 (SB0121) ou dos espaçadores 21 e 37 (SB0295).

Ramos et al. (2014) avaliaram amostras de linfonodo coletadas de vacas leiteiras adultas Holandesas em um abate sanitário, de uma única fazenda, em um frigorífico em Capão do Leão, RS. Entre os 85 isolados de *M. bovis* foram identificados com maior frequência os padrões SB0121 e SB0119.

### 3. JUSTIFICATIVA

A disseminação de diversos microrganismos patogênicos de relevância econômica e sanitária para a bovinocultura foi facilitada por meio do aumento da concentração de bovinos por propriedade, a introdução de material genético proveniente de outros países e a alteração do manejo sanitário e reprodutivo (POLETTTO et al., 2004).

A tuberculose causada por *M. bovis* apresenta grande importância para saúde pública, saúde e produção animal. É crescente a necessidade de desenvolvimento de métodos mais eficazes de diagnóstico, prevenção, controle e erradicação da tuberculose bovina (MURAKAMI et al., 2009). Sua caracterização molecular visa elucidar aspectos acerca da transmissão. O Rio Grande do Sul é um estado com elevada importância na produção brasileira e, de janeiro a julho de 2018, foi responsável pelo abate de 449.148 cabeças (ABIEC, 2018), além de fazer fronteira internacional com Uruguai ao sul e Argentina a oeste e estes serem países onde também há focos da enfermidade. Desta forma, a genotipagem de isolados de *M. bovis* deste estado dará maiores subsídios para o controle da bTB, acelerando a redução de sua prevalência e colaborando com futuras políticas de erradicação da enfermidade.

## 4. OBJETIVO

### Objetivo geral

Investigar a diversidade genética de cepas de *Mycobacterium bovis*, isoladas a partir de tecidos de bovinos do estado do Rio Grande do Sul, por meio da técnica de espoligotipagem

### Objetivo específico

- Isolar *M. bovis* a partir de tecidos de bovinos, provenientes de rebanhos infectados da microrregião de Lajeado-Estrela, estado do Rio Grande do Sul,
- Confirmar *M. bovis* pela técnica de PCR convencional, a partir dos isolados no cultivo micobacteriano;
- Caracterizar e analisar a diversidade genética dos isolados de *M. bovis* pela técnica de espoligotipagem.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Obtenção de material**

Foram obtidas amostras colhidas por meio de necropsia de tecidos de glândulas mamárias e pulmonares e linfonodos retrofaríngeos, intramamários, pulmonares e mesentéricos, com ou sem lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose (LST), provenientes de abatedouros-frigoríficos, sob Serviço de Inspeção Estadual (SIE) ou Federal (SIF), de três rebanhos leiteiros dos municípios de Arroio do Meio e Bom Retiro do Sul, na microrregião de Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul (Figura 4). Estes animais foram abatidos objetivando realizar o vazio sanitário dos rebanhos aos quais pertenciam, em decorrência de surto de bTB. Desta forma, não houve abate de bovinos exclusivamente para estudo, mas para atender a legislação do PNCEBT (abate sanitário).

Todos os animais eram da raça Holandesa e mantidos em sistema semi-intensivo. Dois dos três rebanhos estudados estavam acreditados como livres de TB: rebanho A desde 2010 e rebanho B desde 2013. O rebanho C não era credenciado. No ano de 2014, o teste intradérmico de rotina resultou na detecção de animais positivos nos três rebanhos, que foram abatidos e em 2015, os três rebanhos foram despovoados, totalizando 53 animais abatidos.

As amostras foram acondicionadas em embalagem estéril, identificadas com o número de Guia de Trânsito Animal (GTA) e transportadas sob refrigeração, com destino ao Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, situada em Campo Grande – MS, para posterior análise.



Figura 4: Microrregião Lajeado-Estrela, Rio Grande do Sul, Brasil.

## 5.2 Preparo e cultivo das amostras

### Cultura e identificação de *Mycobacterium bovis*

Amostras de tecido foram mantidas congeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Uma porção (entre 10 e 25 mg) da amostra de cada tecido foi macerada em placa de Petri até que reduzisse de tamanho e o produto da maceração foi colocado em um tubo com esferas de cerâmica (*MagNa Lyser Green Beads* - Roche Life Science), com 1,5mL de água destilada estéril e homogeneizando-os por um sistema mecânico de maceração em aparelho de rotação *MagNa Lyser* (Roche Diagnostic GmbH). Posteriormente foram descontaminados usando o método de Petroff (MAKOVCOVA et al., 2015), centrifugados durante 15 minutos a 3.000 rpm e cultivados em meio

Stonebrink. Na sequência foram incubados em 37°C e, para avaliar o crescimento bacteriano, sendo analisados semanalmente durante um período de até 90 dias.

As colônias com características positivas de *M. bovis* foram submetidas à extração de DNA genômico.

### **Extração de DNA**

As 40 amostras que apresentaram crescimento no meio de cultivo foram submetidas à extração de DNA. As colônias foram lavadas com 500 µL de tampão Tris-EDTA em microtubos e inativadas durante 1 hora a 87°C, e centrifugadas durante 2 minutos a 1.4000 rpm, e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Após a extração, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C para sua conservação até a realização das técnicas de PCR e espoligotipagem.

### **Técnica de PCR**

Colônias sugestivas de *M. bovis* foram submetidas à PCR convencional com os iniciadores Mb.400, que amplificam um fragmento com 400 pares de bases flanqueando a região de diferenciação 4 (RD4), que está ausente nesta espécie, mas presente em todos os outros membros do CMT (Sales et al., 2014).

A amplificação utilizou os *primers* Mb.400.F5'AACGCGACGACCTCATATTC3' e Mb.400.R 5'AAGGCGAACAGATTTCAGCAT3' (SALES et al., 2014), utilizando 25 µL da solução preparada da seguinte maneira:

- 18,0 µL de água ultrapura tipo I
- 2,5 µL de tampão 10X (tris-HCl 10 mM, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM)
- 2,0 µL de amostras de DNA (10 ng)
- 0,5 µL de primer forward (10 µMol)
- 0,5 µL de primer reverse (10 µMol)
- 0,5 µL de oligonucleotídeos (dNTP) (20 mM)
- 0,25 µL de *TaqMan* (5U/µL)

As amostras foram incubadas em termociclador *Bio-Rad Thermal Cycles* (Life Science), seguindo as condições cíclicas de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados pela técnica foram corados com Gel Red, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

### 5.3 Genotipagem das micobactérias – Espoligotipagem

As micobactérias foram genotipadas por espoligotipagem, de acordo com a metodologia padrão descrita por Kamerbeek et al. (1997)

Para que fosse amplificada a região DR, utilizou-se a mistura de reação para a PCR no volume final de 50 µL, contendo:

- 0,2 mM de cada dNTP (10mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM KCl)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 pmol de cada um dos *primers* (DRa, marcado com biotina e DRb)
- 1 U de *Taq* DNA polimerase
- 10 ng de DNA

A PCR ocorreu em ciclagem de temperatura de tal maneira: desnaturação inicial de 96°C durante 3 minutos, 20 ciclos a 96°C durante 1 minuto, 20 ciclos a 55°C durante 1 minuto e 20 ciclos a 30 segundos a 72°C, seguidos da extensão a 75°C durante 5 minutos.

Como controle positivo, foram utilizadas cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG e como controle negativo, água ultrapura.

A hibridação dos produtos da PCR foi realizada em uma membrana de nylon contendo 43 oligonucleotídeos, correspondentes às sequências espaçadoras da região DR e posteriormente incubado com conjugado de estreptavidina-peroxidase e líquido de detecção ECL. Os espaçadores foram visualizados por detecção de quimioluminescência melhorada e os padrões encontrados foram analisados comparando com aqueles já descritos na base de dados (<http://www.mbovis.org>).

Como resultado obtiveram-se os números SB de único padrão, que indicaram a origem do genótipo detectado nas amostras estudadas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 53 lesões sugestivas e bTB, 40 (75,5%) apresentaram colônias com morfologia compatível com *M. bovis* pelo cultivo bacteriológico. Todas as colônias sugestivas foram confirmadas por PCR convencional. Utilizando a técnica de espoligotipagem foi possível identificar polimorfismo entre os isolados, fator importante a ser considerado na epidemiologia da tuberculose bovina no estado do Rio Grande do Sul. O espoligotipo de maior frequência no estudo, foi o SB0121, com 32 isolados (80%), seguido pelo SB0295, observado em 6 isolados (15%) e os dois outros, com apenas um isolado cada (2,5%), foram SB1683 e um padrão não identificado anteriormente, apresentados na tabela 1.

O espoligotipo SB0121, maior frequência, é considerado como majoritário em países como Espanha, México e Portugal (ARANAZ et al., 1996; DUARTE et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2010). Possui ampla distribuição no Brasil, Bélgica, França e Venezuela, bem como em países que são fortemente envolvidos no comércio de gado com estes (ZUMARRAGA et al., 1999; HADDAD et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004; ZANINI et al., 2005; COSTA et al., 2010; PARREIRAS et al., 2012; ZUMARRAGA et al., 2013). Além do SB0121, existe um outro grupo dominante quanto à diversidade de espoligotipos, que é o grupo SB0120, também denominado BCG-like, que possui grande diversidade de hospedeiros, pois, além de bovinos, já foi isolado de cabras, ovelhas, suínos, animais silvestres e infectando até mesmo humanos (HADDAD et al. (2001). A diferença entre os dois é que SB0121, difere da estirpe original (SB0120) apenas pela perda do espaçador 21.

Cazola et al. (2015) observaram uma diversidade genética entre os espoligotipos encontrados em diferentes municípios de Mato Grosso do Sul, porém o perfil



para *M. bovis* BCG, foi observado para sete isolados (3,1%). Os clusters restantes agruparam cinco ou menos isolados.

O padrão SB1040 já foi reportado em países da América Latina, tais como Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Costa Rica (Milián-Suazo et al., 2012). No Brasil, Alzamora Filho et al. (2014) apresenta que na Bahia existem compartilhamentos de espoligotipos (SB295, SB121, SB1055, SB1145 e SB140) com outros estados brasileiros, São Paulo e Minas Gerais, como em outros Países como Argentina, México, Inglaterra, Espanha, Portugal e França.

Rocha et al. (2013) apontam estudos anteriores e indicam os padrões SB0140 é majoritário na Argentina, Irlanda e Reino Unido e já identificado no Paraguai, Uruguai, Brasil e México (ARANAZ et al. 1996; ZUMÁRRAGA et al., 1999; HADDAD et al. 2001, ALZAMORA FILHO et al., 2014). SB0881 identificado na França e no Brasil (HADDAD et al. 2001; RODRIGUEZ et al. 2004). Sandoval-Azuara et al. (2017) apontam o padrão SB2469 como presente na Argentina, Brasil, Costa Rica, Coréia do Sul, Paraguai, Uruguai e Estados Unidos. Lasserre et al. (2018) compararam 186 genomas de cepas do Complexo *M. tuberculosis* isoladas em todo o mundo, e encontramos uma população altamente estruturada em *M. bovis*. Foram sequenciados 23 novos genomas de *M. bovis*, pertencentes a cepas isoladas no Uruguai. A espoligotipagem *in silico* das cepas uruguaias mostrou cinco padrões diferentes: SB0274 (35%), SB0145 (30%), SB0130 (26%), SB0140 (4%) e SB1072 (4%).

Barandiaran et al. (2011) obtiveram 143 isolados característicos de *M. bovis* de linfonodos e vísceras de suínos da região central da Argentina e realizaram espoligotipagem. Encontraram SB0140 como espoligotipo majoritário (58%), que também é o mais prevalente em bovinos no país, além de ser frequente na Austrália e Nova Zelândia. Outro padrão encontrado foi SB0130 (8,4%) e outros com menor frequência (SB0849, SB1600, SB1652, SB1784, SB1786, SB1782 e SB1779). Parreiras et al. (2012) observaram que o tipo SB1055 já havia sido descrito no Paraguai, Uruguai, México, Costa Rica, Brasil e Argentina, sendo neste último, encontrado também o SB0484.

Shimizu et al. (2014) realizaram a genotipagem de *M. bovis*, obtidas de bovinos dos Pampas da Argentina e obtiveram 261 isolados em 32 padrões, sendo 248 (94,6%) agrupados em 18 clusters. O padrão SB0140 representou, em sua totalidade,

39,8% dos isolados. Dividindo os espoligotipos encontrados por cidades, em Buenos Aires, o SB0140 foi composto por 19 (28,4%) dos isolados, SB0145, 24 (35,8%), SB0120, 11 (16,4%) e SB1055, sete (10,4%). Em Córdoba, o SB0140 foi composto por 51 dos isolados (45,5%), SB0145, 10 (8,9%) e SB0153 e SB0484, 9 cada (8%). Em Santa Fé, importante região da indústria de gado leiteiro, o SB0140 foi composto por 34 (41,4%), SB0130, 12 (14,6%) e SB0120, nove (10,9%).

De acordo com Zumárraga et al. (2013), as cepas presentes em diferentes regiões e estados, mas que apresentam o mesmo padrão de espoligotipo, podem ser resultantes da movimentação de animais contaminados entre diferentes regiões.

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo colabora para futuras abordagens de rastreamento das infecções causadas por *M. bovis* no sul do Brasil. A genotipagem de *M. bovis* por meio do método de espoligotipagem demonstrou que os resultados obtidos podem contribuir com estudos epidemiológicos acerca do bacilo bovino. A técnica se mostrou eficiente para detectar e caracterizar a variabilidade genética dos isolados e determinar relações entre as cepas. A aplicação do método em isolados obtidos de um rebanho infectado com tuberculose bovina no estado do Rio Grande do Sul demonstra a diversidade genética entre as cepas em circulação, apesar da existência de um grupo predominante, SB0121. A diversidade encontrada foi baixa, tendo em vista que 80% dos isolados pertenciam ao mesmo padrão de espoligotipo. As criações da região estudada possuem a característica de serem fechados, ou seja, há pouca introdução de animais, reduzindo a variabilidade genética dos rebanhos, o que explica o resultado obtido.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; van HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; van PITTIUS, N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, p. 1296-1299, 2010.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. Meat and milk black market - bovine tuberculosis. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ALMEIDA, I. B.; LIMA, A. F.; MIRANDA, M. V. F. G.; LIMA, P. O. Tuberculose x zoonose: um risco eminente para saúde ocupacional das comunidades rurais. **Revista Científica Rural**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 259-273, 2017.
- ALMEIDA, M. A. Z.; CHIMINAZZO, C.; COSTA, F. M. Ocorrência de tuberculose bovina em propriedades leiteiras nos municípios de Guaíba e Eldorado do Sul - Rio Grande do Sul. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, Porto Alegre, v. 1, p. 167, 1997.
- ALVAREZ, J.; PEREZ, A. M.; BEZOS, J.; CASAL, C.; ROMERO, B.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SAEZLLORENTE, J. L.; DIAZ, R.; CARPINTERO, J.; DE JUAN, L.; DOMÍNGUEZ, L. Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 year period. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 100, p. 2-8, 2012.
- ALZAMORA FILHO, F.; VASCONCELLOS, S. E. G.; GOMES, H. M.; CAVALCANTE, M. P.; SUFFYS, P. N.; COSTA, J. N. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium*

*bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 103-108, 2014.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos. 2.ed.;1080p. São Paulo: Editora Roca, 2008.

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

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 49, n. 3, p. 1263-1273, 1999.

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

ARAÚJO, C. P.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S. G.; RAMOS, C. A. N.; SOUZA FILHO, A. F.; VIDAL, C. E. S.; VARGAS, A. P. C.; ROXO, E.; ROCHA, A. S.; SUFFYS, P. N.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; SILVA, M. R.; BARBOSA NETO, J. D.; CERQUEIRA, V. D.; ARAÚJO, F. R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 633-640, 2014.

BAHIENSE, L.; BAVIA, M. E.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3549-3560, 2016.

BARANDIARAN, S.; VIVOT, M. M.; MORAS, E. V.; CATALDI, A. A.; ZUMÁRRAGA, M. J. *Mycobacterium bovis* in Swine: Spoligotyping of Isolates from Argentina. **Veterinary Medicine International**, V. 2011, 2011.

BARBIERI, J. M.; OLIVEIRA, L. F.; DORNELES, E. M. S.; MOTA, A. L. A. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MALUF, P. P.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; LAGE, A. P. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suplemento 2, p.3531-3548, 2016.

BASSO, A. J. *Genotipagem utilizando a sequência de inserção IS6110, de cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas de pacientes portadores da infecção pelo HIV em Moçambique, África*. 2006. 71f. Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BERG, S.; FIRDESSA, R.; HABTAMU, M.; GARDISA, E.; MENGISTU, A.; YAMUAH, L.; AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ROBERTSON, B. D.; SMITH, N. H.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, R. G.; ASEFFA, A.; GORDON, S. V. The Burden of Mycobacterial Disease in Ethiopian Cattle: Implications for Public Health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 4, 8p, 2009.

BESSELL, P. R.; ORTON, R.; WHITE, P. C. L.; HUTCHINGS, M. R.; KAO, R. R. Risk factors for bovine Tuberculosis at the national level in Great Britain. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 51, 2012.

BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E. Tuberculose em animais domésticos. **PUBVET**, Maringá, v. 2, n. 2, p. 1-31, 2008.

BORGES, M.; CAFRUNE, P. I.; POSSUELO, L. G.; VALIM, A. R. M.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L. R. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, n. 4, 2004.

BRASIL. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 43p, 2007.

BRASIL. *Programas de Saúde Animal. Estudos de prevalência de brucelose e tuberculose*. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa SDA n.10, de 3 de março de 2017. Estabelece o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 23p. 2017.

BRASIL. Produção da Pecuária Municipal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 44, 53p, 2017.

BRASIL. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2016.IV e 2017.IV. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 2017

BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 184p. 2006.

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

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, n. 2, p. 339-345, 2013.

CAZOLA, D. O.; JORGE, K. S. G.; ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUZA-FILHO, A. F.; ARAÚJO, F. R.; OSÓRIO, A. L. A. R. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.35, n.2, p.141-147, 2015.

CORDOVA, E.; GONZALO X.; BOSCHI, A.; LOSSA, M.; ROBLES, M.; POGGI, S.; AMBROGGI, M. Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology,

microbiology and clinical presentation. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 3, p. 415–417. 2012.

CORRÊA, F. A. F. *Formas de diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis e Mycobacterium bovis*. 2011. 40f. Apresentado à Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2011.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F.; de KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 59-70, 1998.

COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. D. Tipificação genética, através da técnica de spoligotyping, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 233-237, 2010.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. "Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

DUARTE, E.L.; DOMINGOS, M.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 415-421, 2008.

DUFFIELD, B. J.; YOUNG, D. A. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 193-197, 1985.

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**, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3385-3402, 2016.

FURLANETO, I. P.; CONCEIÇÃO, E. C.; BRITO, M. L.; COSTA, A. R. F.; MONTEIRO, J. J. B.; GONÇALVES, N. V.; GOMES, H. M.; LIMA, K. V. B. Genotipagem por spoligotyping de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de lâminas de Ziehl-Neelsen em Belém, estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica da Saúde**, Ananindeua, v. 4, n. 1, p. 33-41. 2013.

GALVIS, J. O. A.; GRISI FILHO, J. H. H.; 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 Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3567-3578, 2016.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, p. 71-77, 2001.

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

HOMEM, V. S. F.; HIGA, Z. M. M.; FERREIRA NETO, J. S. Proposed model to study the economic impact of bovine brucellosis and tuberculosis: Case study of Pirassununga, SP, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3793-3802, 2016.

HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **BMC Veterinary Research**, v. 40, n. 5, p. 1-24, 2009.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, 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**, Washington, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KICH, D. M., KRELING, C. S., POZZOBON, A. Análise da presença de *Mycobacterium bovis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de leite bovino in natura na região do Vale do Taquari, RS. **Revista Destaques Acadêmicos**, Vale do Taquari, v. 4, n. 3, p. 19-26, 2012.

LASSERRE, M.; FRESIA, P.; GREIF, G.; IRAOLA, G.; CASTRO-RAMOS, M.; JUAMBELTZ, A.; NUÑEZ, A.; NAYA, H.; ROBELLO, C.; BERNÁ, L. Whole genome sequencing of the monomorphic pathogen *Mycobacterium bovis* reveals local differentiation of cattle clinical isolates. **BMC Genomics**, v. 19, n. 2, p. 1-14, 2018.

LEONARDI, S. M. *incidência de tuberculose em matadouro-frigorífico municipal na região da fronteira oeste*. 2013. 21f. Monografia de Especialização). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LOPES FILHO, P. R. *Perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008*. 2010. 41f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

MAKOVCOVA, J.; BABAK, V.; SLANY, M.; SLANA, I. Comparison of methods for the isolation of mycobacteria from water treatment plant sludge. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 5, p. 1165-1179, 2015.

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

MARTINS, L. L.; MAROSO, M. T. D. Ocorrência de tuberculose e brucelose em rebanhos bovinos da região do Alto Uruguai - RS nos anos de 2010, 2011 e 1º semestre de 2012. **Informativo Técnico** n.12, ano 03, 2012.

MATOS, F.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: A case report. *Veterinarni Medicina* v. 55, p. 133-136, 2010.

MICHAEL, A. L., VAN HELDER, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal human interface: A problem, or not? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 371-381, 2010.

MILIÁN SUAZO, F.; CASANOVA, L. G.; TORRES, C. R.; ALARCÓN, G. J. C.; REYES, J. A. G.; SOSA, S. G.; PEZZAT, M. M.; ESTRADA, F. M. F.; CISNEROS, A. L. P.; CHÁVEZ, C. E.; OSCAR PIZANO MARTÍNEZ, O. P. Genetic diversity and geographic distribution of *Mycobacterium bovis* from cattle in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, v. 3, n. 4, p. 459-471, 2012.

MÜLLER, B.; DÜRR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C. J. M.; PARSONS, S. D. C.; van HELDEN, P. D.; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* – induced Tuberculosis in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta v. 19, n. 6, p. 899–908, 2013.

MURAKAMI, P. S.; FUVERKI, R. B. N.; NAKATANI, S. M.; FILHO, I. R. B.; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2009.

NEGRI FILHO, L. C.; ANDRADE, L. V. A.; CHINEZE, P. H. N.; AFFONSO, M. Z.; SANTOS, M. D.; BARCA JUNIOR, F. A.; BOGADO, A. L. G.; SILVA, L. C.; WERNER OKANO, W. Hematological parameters of Holstein breed bovines: the influence of by the tuberculin comparative test. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 4, p. 66-78, 2014.

NEILL, S. D; POLLOCK; J. M; BRYSON; D. B; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.4152, 1994.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A.; POLLOCK, J. M. Tuberculosis: new light from an old window. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 98, p. 1261-1269, 2005.

OCEPEK, M.; PATE, M.; ŽOLNIR-DOVČ, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3555-3557, 2005.

OIE - World Health Organization. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May (2009). Chapter 2.4.7, Bovine Tuberculosis. *Terrestrial Manual*. Acessado em: 05 de abril de 2018. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)

OIE - World Organization for Animal Health 2010. World Animal Health Information Database - WAHID Interface (database on the Internet). Acessado em: 03 de julho de 2018. Disponível em: [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_timelines](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines).

OLEA-POPELKA, F.; MUWONGE, A.; PERERA, A.; DEAN, A. S.; MUMFORD, E.; ERLACHER-VINDEL, E.; FORCELLA, S.; SILK, B. J.; DITIU, L.; EL IDRISSE, A.; RAVIGLIONE, M.; COSIVI, O.; LOBUE, P.; FUJIWARA, P. I. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. **Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 21–25, 2017.

OLIVEIRA, T. M. S. *PCR em tempo real: métodos e aplicações*. 2010. 111f. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia. Aveiro, 2010.

O'REILLY, L. M., DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tuberculosis and Lung Disease**, v.76, suppl. 1, p. 1-46, 1995.

PALMER, M. V. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**. Suppl 1, p. 1-13, 2013.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181-190, 2006.

PANDOLFI, J.R; MALASPINA, A.C; SANTOS, A.C.B; SUFFYS, P.N; OELLEMANN, M.A.C; VALENTINI, S.R; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p.251 - 257, 2007.

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* isolates from cattle in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 64-73, 2012.

PARSONS, S. D.; DREWE, J. A.; GEY van PITTIUS, N. C.; WARREN, R. M.; van HELDEN, P.D. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa." **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, p. 2004-2007, 2013.

PATANÉ, J. S. L.; MARTINS JÚNIOR, J.; CASTELÃO, A. B.; NISHIBE, C.; MONTERA, L.; BIGI, F.; ZUMÁRRAGA, M. J.; CATALDI, A. A.; FONSECA JUNIOR, A.; ROXO, E.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S.; THACKER, T. C.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, F. R.; SETUBAL, J. C. Patterns and Processes of *Mycobacterium bovis* Evolution Revealed by Phylogenomic Analyses. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2017.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, suplemento 1, p. 1-5, 2009.

POLETO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalence of tuberculosis, brucellosis and viral infections in dairy cattle from the county of Passo Fundo, RS, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

QUEIROZ, M. R.; GROFF, A. C. M.; SILVA, N. S.; GRISI FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA, F. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3647-3658, 2016.

RAMÍREZ-VILLAESCUSA, A. M.; MEDLEY, G. F.; MASON, S.; GREEN, L. E. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 3-4, p. 224-230, 2010.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de ruminantes e equinos**. 3.ed, Santa Maria: Pallotti, 722p, 2007.

RAMOS, D. F.; SILVA, A. B. S.; FAGUNDES, M. Q.; von 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. M. *Discriminação de isolados de Mycobacterium bovis pelas técnicas de Spoligotyping, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas*. 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROCHA, V. C. F.; FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A. R.; HILDEBRAND, J. H. F. G.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 17-21, 2013.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; SAÉZ-LLORENTE, L.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; JIMENEZ, A.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Limitations of Spoligotyping and Variable-Number Tandem-Repeat Typing for Molecular Tracing of *Mycobacterium bovis* in a High-Diversity Setting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 3361-3364, 2011.

RODRIGUES, C. A.; MEDEIROS, E.; MELLO, G. C.; FAVARO, M. R. Controle da Tuberculose Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, n. 11, ano VI, 2008.

RODRIGUES, R. A.; MENESES, I. I. F. S.; JORGE, K. S. G.; SILVA, M. R.; SANTOS, L. R.; LILENBAUM, W.; ETGES, R. N.; ARAÚJO, F. R. False-negative reactions to the comparative intradermal tuberculin test for *bovine tuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 12, p. 1380-1384, 2017.

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

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

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.

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

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.

SALES, M.L.; FONSECA, A.A. JR.; SALES, E.B.; COTTORELLO, A.C.; ISSA, M.A.; HODON, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; RAMALHO, A.K.; SILVA, M.R.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. 2014. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 433-438, 2014.

SANABRIA, L.; LAGRAVE, L.; NISHIBE, C.; RIBAS, A. C. A.; ZUMÁRRAGA, M. J.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, F. R. Draft genome sequences of two *Mycobacterium bovis* strains isolated from beef cattle in Paraguay. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, n. 28 e00616-17, 2017.

SCHUMACHER, G.; MARION FILHO, P. J. A expansão da pecuária no Rio Grande do Sul e o transbordamento na produção de leite (2000 – 2010). **Gestão & Regionalidade**, São Caetano do Sul, v. 29, n. 87, set-dez, 2013

SHIMIZU, E.; MACÍAS, A.; PAOLICCHI, F.; MAGNANO, G.; ZAPATA, L.; FERNÁNDEZ, A.; CANAL, A.; GARBACCIO, S.; CATALDI, A.; CAIMI, K.; ZUMÁRRAGA, M. Genotyping *Mycobacterium bovis* from cattle in the Central Pampas of Argentina: temporal and regional trends. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 2, p. 236-245, 2014.

SILVA, M. R.; ROCHA, A. D. S.; ARAÚJO, F. R.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; ALENCAR, A. P.; SUFFYS, P. N.; COSTA, R. R. D.; MOREIRA, M. A. S.; GUIMARÃES, M. D. C. Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 112-118, jun 2018

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** London, 30: 225-420

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

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

SOLA C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution** 3, p. 125–133. 2003.

SOUSA E SILVA, G.; COSTA, E.; BERNARDO, F. A.; GROFF, F. H. S.; TODESCHINI, B.; SANTOS, D. V.; MACHADO, G. Cattle Rearing in Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1-7, 2014

SOUZA-FILHO, A. F.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S. G.; ARAÚJO, F. R.; VIDAL, C. E. S.; ARAÚJO, C. P.; ALBERTTI, L. A. G.; CAZOLA, D. O.; FERREIRA NETO, J. S.; HEINEMANN, M. B. Genetic profiles of *Mycobacterium bovis* from a cattle herd in Southern most Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3647-3658, 2016.

SPKOWITZ, K. A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T. E.; ARMSTRONG, D. Tuberculosis in The Aids era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 180-199, 1995.

STREICHER, E. M.; VICTOR, T. C.; VAN DER SPUY, G.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M. Spoligotype Signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 1, p. 237–240, 2007.

STROHL W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. Microbiologia ilustrada. Porto Alegre: Artmed; p. 259-272, 2004.

SANDOVAL-AZUARA, S. E.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; PEREA-JACOBO, R.; ROBBE-AUSTERMAN S4,PERERA-ORTIZ, A.; LÓPEZ-VALENCIA, G.; BRAVO, D. M.; SANCHEZ-FLORES, A.; MIRANDA-GUZMÁN, D.; FLORES-LÓPEZ, C. A.; ZENTENO-CUEVAS, R.; LANIADO-LABORÍN, R.; de LA CRUZ, F. L.; STUBER, T. P. Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 48-56, 2017.

THOEN, C.; LOBUE, P.; de KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 339-345, 2006.

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

van SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; de HAAS, P. E.; HERMANS, P. W.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L. M.; van EMBDEN, J. D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 47, n. 4, p. 1236-45, 1997.

VAYR, F.; MARTIN-BLONDEL, G.; SAVALL, F.; SOULAT, J. M.; GAETAN DEFFONTAINES, G.; HERIN, F. Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 1, 14p, 2018.

VIALE, M. N., ZUMÁRRAGA, M. J., ARAÚJO, F. R., ZARRAGA, A. M., CATALDI, A. A., ROMANO, M. I.; BIGI, F. The genomics of mycobacteria. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 35, n. 1, p. 229-240, 2016.

WHELAN, A. O.; CLIFFORD, D.; UPADHYAY, B.; BREADON, E. L.; MCNAIR, J.; HEWINSON, G. R.; VORDERMEIER, M. H. Development of a skin test for Bovine Tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3176-3181, 2010.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T.; OLIVEIRA, R. S.; LEO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 809-813, 2001.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P.; BAROUNI, A. S.; ROXO, E.; TELLES, M. A.; ZUMARRAGA, M. J. Molecular Typing of *Mycobacterium*

*bovis* Isolates from South-east Brazil by Spoligotyping and RFLP. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 129–133, 2005.

ZUMÁRRAGA, M. J.; ARAÚJO, F. R.; CATALDI, A. A. Population structure, genotypes and pathogenic phenotype of *Mycobacterium bovis* in Argentina (and Latin America). **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, p. 30–31, 2015.

ZUMÁRRAGA, M. J.; ARRIAGA, C.; BARANDIARAN, S.; COBOS-MARÍN, L.; de WAARD, J.; ESTRADA-GARCIA, I.; FIGUEIREDO, T.; FIGUEROA, A.; GIMÉNEZ, F.; GOMES, H. M.; GONZALEZ-Y-MERCHAND, J. A.; MACÍAS, A.; MILIÁN-SUAZO, F.; RODRÍGUEZ, C. A. R.; SANTILLÁN, M. A.; SUFFYS, P. N.; TRANGONI, M. D.; ZÁRRAGA, A. M.; CATALDI, A. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 9–21, 2013

ZUMÁRRAGA, M. J.; CARLOS MARTIN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; ERRICO, F.; RAMOS, M. C.; CATALDI, A.; van SOOLINGEN, D.; ROMANO, M. I. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 296–30, 1999.

ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUTULLO, A.; GARCÍA, M. I.; MARINI, R.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ECHAIDE, S.; LÓPEZ, M.; ZERVINI, E.; CANAL, A.; CATALDI, A. A. Detection of *Mycobacterium bovis* – Infected Dairy Herds Using PCR in Bulk Tank Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, p. 132-137, 2012.