

Érica Bravo Sales

**GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium bovis* PELO *MULTISPACER*
*SEQUENCE TYPING***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Marcos Bryan Heinemann

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2012**

S163g Sales, Érica Bravo, 1980-
Genotipagem de *Mycobacterium bovis* pelo *Multispacer Sequence Typing* /
Érica Bravo Sales. – 2012.
65 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola
de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Tuberculose em bovino – Teses.
3. Micobactérias – Identificação – Teses. 4. *Mycobacterium bovis* – Teses.
I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola
de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 699 5

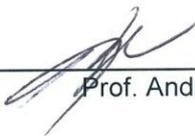
Dissertação defendida e aprovada em 02 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente



Prof. Sidnei Myoshi Sakamoto



Prof. Andrey Pereira Lage

Nasceste no lar que precisavas,

Vestiste o corpo físico que merecias,

Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento. Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.

Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização. Teus parentes, amigos são as almas que atraíste, com tua própria afinidade. Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.

Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a existência. Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes... São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência.

Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e observa. A mudança está em tuas mãos. Reprograme tua meta, busque o bem e viverás melhor.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim".

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

À minha família, que esteve sempre ao meu lado, ainda que distantes! Obrigada pela força, pelo apoio e pelo incentivo. Amo vocês mais que tudo nessa vida!

À família Minardi da Cruz por me receber em Belo Horizonte me oferecendo todo o suporte que eu precisava para começar essa caminhada. Obrigada pelo carinho, pela confiança e pelos momentos de alegrias que desfrutamos juntos.

À pequena Carol, por me mostrar que o tamanho pode ser inversamente proporcional ao nosso potencial, basta acreditar e seguir em frente que tudo termina bem.

À Crisota, sem você a realização desse trabalho não teria sido possível! Agradeço sua dedicação, paciência e principalmente sua amizade. Adoro você!

À Tati-Tati, por todos os sorrisos oferecidos nesses três anos de convivência. Obrigada por ser única, transparente, sincera e verdadeira. Aprendi muito com você!

Ao sempre bem humorado Natanael, pela prestatividade constante, pelo carinho e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Antônio, obrigada pelo ensinamento de cada dia, pela paciência constante, por acreditar no meu trabalho e por permitir a realização de mais esse sonho. Obrigada por me mostrar que uma boa liderança se realiza com respeito, sabedoria, bom humor e um toque de simplicidade.

À Aninha agradeço a prestatividade, o incentivo, a dedicação e a alegria compartilhados durante nossa convivência.

Aos amigos do LANAGRO, por cada pequeno momento de alegria, que juntos, constituíram três maravilhosos anos trabalhados.

Ao Simone, que esteve sempre ao meu lado, entre idas e vindas, ajudando, ouvindo, mostrando que é preciso perseverar na dificuldade para alcançar o objetivo desejado. Obrigada pelo companheirismo, pela dedicação, paciência e por todo o amor dedicado.

Ao professor e orientador Marcos Bryan, pela atenção e disposição em ajudar-me. Depois de tantos “por favor” não poderia terminar de outra forma que não fosse MUITO OBRIGADA, MESMO!

Ao MAPA, INCT, CNPq, FAPEMIG e FEPMVZ pelo incentivo financeiro.

Ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, por ceder os resultados de *Spoligotyping* utilizados para complementar o estudo. Aos colegas do laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária pela disponibilidade, compreensão e compromisso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Agente etiológico e transmissão	15
2.2. Epidemiologia e controle da tuberculose bovina	16
2.3. Genoma e Evolução do <i>Mycobacterium bovis</i>	19
2.3.1 Genoma do <i>M. bovis</i>	19
2.3.2. Estrutura da população do <i>M. bovis</i>	20
2.3.3. Filogenia do <i>M. bovis</i>	21
2.3.3.1. Regiões de diferença (RD).....	21
2.3.3.2 Elementos móveis (IS)	22
2.3.3.3 Sequências repetitivas DR (<i>Direct Repeat</i>)	23
2.4. Complexos clonais de <i>M. bovis</i>	24
2.5. Diagnóstico	25
2.6. Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem dos membros do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
2.6.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	27
2.6.2. Spoligotyping.....	27
2.6.3 VNTR (Variable Number Tandem Repeat).....	28
2.6.4. MST (Multispacer Sequence Typing).....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Delineamento experimental.....	31
3.2. Amostras	32
3.3. Local	33
3.4. Extração do DNA genômico	33
3.5. Avaliação do grau de pureza do DNA extraído	33
3.6. Seleção dos iniciadores e padronização das reações de PCR	33
3.7. Sequenciamento dos fragmentos de DNA alvo do estudo	37
3.7.1. Reações de PCR e purificação dos produtos de PCR.....	37
3.7.2. Reação de sequenciamento	37
3.7.3. Purificação dos produtos da reação de sequenciamento	37
3.7.4. Eletroforese Capilar	38
3.8. Análise de dados	38
3.8.1. Edição das sequências	38
3.8.2. Cálculo da diversidade alélica	40
3.8.3. Análises da relação de parentesco entre os isolados.....	40
3.8.4. Análise da frequência alélica das sequências tipo identificadas no estudo	41
3.8.5. Análise Filogenética.....	41
3.8.6. Análise da região de diferença RD Euro1	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Definição dos perfis genotípicos.....	44
4.2. Análises de descendência evolutiva dos isolados de <i>M. bovis</i>	46
4.2.1 Relação entre isolados de <i>M. bovis</i> procedentes de Minas Gerais	46

4.2.2.	Relação entre isolados de <i>M. bovis</i> procedentes de seis estados do Brasil.....	47
4.2.3.	Análises dos isolados de <i>M. bovis</i> de 2006 e 2007 juntamente com o <i>Spoligotyping</i>.....	48
4.3.	Análises Filogenéticas.....	50
4.4.	Índice Hunter-Gaston (HGI).....	51
4.5.	Análise da região de diferença RDEu1.....	51
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÕES	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Amostras de <i>M. bovis</i> procedentes de rebanhos bovinos de seis estados brasileiros (Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Mato Grosso) isoladas entre os anos de 2006 a 2010.	32
Tabela 2.	Iniciadores utilizados para amplificação por PCR de DNA de <i>M. tuberculosis</i> propostos por Djelouadji <i>et al.</i> (2008) e ciclagem padronizada para amplificação por PCR das regiões espaçadoras alvo do estudo.	34
Tabela 3.	Identificação dos isolados de <i>M. bovis</i> analisados no estudo, ano de isolamento, localização geográfica, perfil de espoligotipo e município de origem do animal.....	39
Tabela 4.	Identificação, sequência nucleotídica e posição da sequência alvo no genoma de H37Rv dos iniciadores utilizados para a reação de PCR para detecção da RD Euro1.	42
Tabela 5.	Identificação de 28 ST únicas geradas pela comparação de 63 perfis genotípicos de isolados de <i>M. bovis</i> . ST identifica a sequência tipo que caracteriza um perfil genotípico (ou alélico) e representa os isolados que definiram perfis genotípicos idênticos; Perfil alélico representa o número identificador designado a cada alelo para cada espaçador que juntos, identificam uma ST; A Frequência revela o número de isolados que apresentaram perfis idênticos e a porcentagem (%) indica os valores em porcentagem sobre o total de 63 amostras que constituíram o estudo.	45
Tabela 6.	Representação da frequência alélica determinada pelo programa START2 a partir dos isolados de <i>M. bovis</i> para cada <i>locus</i> analisado neste estudo.	46
Tabela 7.	Identificação dos isolados de <i>M. bovis</i> relativos aos anos de 2006 e 2007 utilizados neste estudo, acompanhados pelos seus respectivos perfis de ST, resultado da RDEu1 e padrão de espoligotipo.....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A figura mostra a representação dos alelos identificados para cada região espaçadora alvo do estudo. MST4 (ETR-B): oito alelos contendo de 1-7 cópias de 57 bp de sequências repetidas em tandem (TR) e a presença de um SNP G47A; MST5: deleção de 67 bp; MST7: quatro alelos contendo de 1-4 cópias de 57 bp de repetição em tandem, uma deleção de 11 bp na primeira repetição para todas as amostras e um SNP D80A; MST9: três alelos contendo 1 e 3 cópias de repetição em tandem de 54 bp e uma sequência com 3 repetições em tandem representada por alguns polimorfismos no genoma de *M. bovis*, caracterizado por um alelo diferente, de uma região repetitiva também presente no genoma de *M. avium*; MST11: três alelos contendo 3, 5 e 6 cópias repetidas em tandem de 57 bp, sendo a primeira e a última repetição caracterizada pela deleção de 11 bp em todos os isolados.; MST12: cinco alelos contendo de 1-4 cópias de repetição em tandem de 77 bp, com a primeira repetição caracterizada por uma deleção de 37 bp em todos os isolados. Também foi revelado a inserção de uma base G76, um SNP A424G, um SNP T485A e uma deleção de 18 bp após a última repetição; MST13: três alelos contendo de 1-3 cópias de 57 bp e uma deleção de 23 bp na primeira repetição em todos os isolados. 43
- Figura 2. Representação dos SNPs identificados na região espaçadora MST14. O alinhamento A corresponde ao SNP A101T, o alinhamento B corresponde ao SNP A305G e o C ao C751A 44
- Figura 3. Dendrograma da distribuição de 49 amostras de *M. bovis* procedentes de 25 municípios de Minas Gerais, isolados entre os anos de 2006 a 2010, quatro amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02, CR13 e CR36) e a cepa *M. bovis* AF2122/97. O dendrograma revela a identificação de quatro complexos clonais (ST6, ST11, ST17 e ST59) formados a partir da comparação de 24 sequências tipo. Na legenda inserida na figura as cores representam o município de origem do animal, n indica o número de isolados com um mesmo perfil genotípico e também está associado ao tamanho do círculo (quanto maior o círculo, maior a população representada por ele). Círculos com mais de uma cor indicam isolados com um mesmo perfil genotípico, mas procedentes de municípios diferentes. 47
- Figura 4. Dendrograma da distribuição de 59 isolados de *M. bovis* procedentes de diferentes estados do Brasil, quatro amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02, CR13 e CR36) e a cepa *M. bovis* AF2122/97, totalizando 63 amostras. As cores nos círculos indicam o Estado de origem do animal: azul (Minas Gerais), verde (São Paulo), Amarelo (Mato Grosso), violeta (Goiás), roxo (Paraná), azul escuro (Rio Grande do Sul) e cinza (representa as amostras padrão de *M. bovis* cedidas pela Fiocruz juntamente com a cepa AF2122/97. 48

Figura 5.	Dendrograma da distribuição de 13 sequências tipo e oito padrões de espoligotipo determinados pelo MST e <i>Spoligotyping</i> , respectivamente. Os dados foram obtidos a partir de 28 isolados de <i>M. bovis</i> provenientes de 14 municípios de MG e isolados entre os anos 2006 e 2007. As cores representam os diferentes padrões de espoligotipo e n indica o número de isolados com um mesmo perfil genotípico.	49
Figura 6.	Árvore filogenética gerada pelo programa PubMLST. O modelo utilizado foi o Neighbor-Joining e a construção foi feita com base nas 28 sequências tipo identificadas neste estudo. Foi observada a formação de cinco clados identificados por letras e cores da seguinte forma: clado A (azul), clado B (laranja), clado C (amarelo), clado D (liláz) e clado E (verde).	51
Figura 7.	Eletróforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para análise da região de diferença RDEu1. MM - marcador de peso molecular de DNA 100 bp (New England Biolabs – NEB), 1- amostra 11/06, 2- 12/06, 3- 13/06, 4- 14/06, 5- 01-07, 6- controle positivo <i>M. bovis</i> CR02, 7- <i>M. tuberculosis</i> CR23 8- controle negativo.	53

RESUMO

O *Mycobacterium bovis*, causador da tuberculose bovina, está entre as espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença causada pelo bacilo bovino constitui um grave problema devido aos prejuízos diretos causados por esta enfermidade e possíveis barreiras sanitárias na exportação. O genoma do *M. bovis* é >99,95% geneticamente idêntico ao de *M. tuberculosis*, dificultando o diagnóstico. A tipificação molecular permite inovar a identificação de uma espécie e ao mesmo tempo gerar genótipos mediante a combinação de diferentes marcadores polimórficos, contribuindo para a sua investigação epidemiológica. As técnicas mais utilizadas atualmente para tipificar o patógeno *M. bovis* são o *Spoligotyping* e o VNTR, no entanto, esses métodos não são capazes de reconhecer toda a diversidade genética dos isolados analisados como é o caso de métodos baseados em sequenciamento, que permitem a análise de sequências alvos moleculares, identificando dessa forma todos os eventos genéticos presentes no marcador utilizado. O objetivo deste trabalho foi tipificar isolados de *Mycobacterium bovis* pela técnica *Multispacer Sequence Typing* (MST). Sete regiões espaçadoras intergênicas foram analisadas para um total de 58 isolados de *M. bovis* relativos aos anos de 2006 a 2010, procedentes de fazendas localizadas em seis estados brasileiros (MG, GO, SP, MT, PR, RS) e para quatro amostras padrão de *M. bovis*. Quatro tipos de eventos genéticos foram observados: mutação de nucleotídeo único (SNP), inserção, deleção e repetição em tandem (TR), totalizando a partir da combinação dos genótipos obtidos um total de 28 eventos. Os resultados, obtidos pela comparação *in silico* entre os fragmentos gerados pelo sequenciamento e a cepa padrão *M. bovis* AF2122/97 [Genbank [BX248333.1](#)] permitiu identificar 28 perfis genotípicos únicos, caracterizando 28 sequências tipo (ST) na amostragem analisada e apontando um índice de discriminação de 93%. Esses dados foram utilizados para analisar os padrões de descendência evolutiva dos isolados de *M. bovis* e correlacioná-los a linhagens filogeográficas com base na formação de complexos clonais gerados a partir do eBURST. Este foi o primeiro trabalho a identificar a variabilidade dos isolados de *M. bovis* pelo método MST. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, dado que o método permitiu tipificar e diferenciar isolados de *M. bovis* a partir do sequenciamento de poucas regiões espaçadoras, mesmo em localizações restritas e em um período de tempo curto como foi verificado no município de Bueno Brandão. O método apresenta a vantagem do sequenciamento e a disponibilização de sequências analisadas em bancos de dados públicos, que podem ser utilizadas por profissionais em todo o mundo como ferramenta para análises futuras.

Palavras-Chave: *Mycobacterium bovis*, genotipagem, *multilocus*, sequenciamento

ABSTRACT

Mycobacterium bovis, which causes bovine tuberculosis, is a species belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex. It shows 99.9% of genetic homology with other species of the complex, making the diagnosis difficult. The bovine bacilli represent a serious problem due to the direct losses in cattle, caused by such infirmity and possible sanitary barriers to exportation. Molecular typing, provide an innovative way to identify bacterial strains, trough generate while genotypes by combining different polymorphic DNA markers, contributing to their epidemiological investigation. The techniques currently used for typing of *M. bovis* are Spoligotyping and VNTR. However these methods are not able to recognize all genetics analyzed strains diversity such as sequencing methods based in last ones allow analyzing molecular target sequence, thereby identifying all events present in the genetic marker used. This paper aims standardize *Multispacer Sequence Typing* (MST) for *M.bovis* genotyping. Seven intergenic spacer region were analyzed on 58 *M.bovis* samples, coming from six brazilian's states (MG, GO, SP, MT, PR, RS), isolated between 2006 and 2010, and on four *M.bovis*'s reference strains. Four types of genetic events were observed: nucleotide mutation (SNP), insertion, deletion and tandem repeat (TR), totaling from the combination of genotypes obtained a total of 28 events. Twenty-eight type sequences (TS) have been also produced, showing a discrimination index of 93%, including the standard strain AF2122/97 [Genbank BX248333.1] used for comparison *in silico*. These data were used to analyze the pattern of evolutionary lineage of *M. bovis*'s isolates and correlate them with phylogeographic lineages, based on the formation of clonal complexes, generated from eBURST. This is the first study aimed identify the variability of isolates of *M. bovis* using MST method. Results were quite satisfactory. Method allowed us to typing and differentiate *M.bovis* isolate from a sequencing of few regions, even in restricted locations and in short a time as established in Bueno Brandao city. The method has the sequencing advantage and the availability of sequences analyzed in public databases which can be used by professionals around the world as an analyzes tool.

Keywords: Mycobacterium bovis, genotyping, multilocus, sequencing

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose, considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, é uma doença infecto-contagiosa causada por micobactérias (Mokaddas e Ahmad, 2007). Responsável por aproximadamente dois milhões de óbitos todos os anos, é considerada a principal causa de morte provocada por um único agente (Ruggiero et al., 2007). Esta doença acomete o homem há milênios, como observado em esqueletos fósseis de seres humanos com lesões ósseas compatíveis com essa enfermidade, encontrados em várias regiões e datados desde cinco mil a.C. (Marques e Cunha, 2003). Com os movimentos migratórios e as grandes guerras, a doença espalhou-se pelo mundo e, nos dias de hoje, continua sendo grande foco de atenção (Pandolfi et al., 2007).

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Micobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, com mais de 120 espécies descritas. Inclui importantes patógenos de seres humanos, causando doenças como Tuberculose, Hanseníase, Úlcera de Buruli e outras doenças emergentes induzidas por micobactérias atípicas que infectam pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou outros indivíduos imunodeprimidos (Zakham et al., 2011).

As principais espécies de importância epidemiológica para o homem pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex – MTBC) do qual fazem parte dentre outros, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. canetti* (Brosch et al., 2002). O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* destacam-se por serem os agentes causadores da tuberculose humana e bovina, respectivamente. A cepa infectante bovina é a mais patogênica dentre as espécies deste complexo, apresenta uma das maiores gamas de hospedeiros conhecidos, sendo capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem (O'Reilly e Daborn, 1995).

A tuberculose bovina é uma doença de alta relevância dentro do contexto da pecuária. É uma zoonose de evolução crônica, caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem ser localizadas em qualquer órgão ou tecido (Brasil, 2006). Integra o grupo de doenças notificáveis da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), importantes do ponto de vista socioeconômico e sanitário nacional, cujas repercussões no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis (Acha e Szyfres, 2001). A tuberculose bovina possui distribuição mundial sendo responsável por determinar morbidade e mortalidade em bovinos em várias partes do mundo, concentrando-se principalmente em países em desenvolvimento onde há criações intensivas, como em bovinos leiteiros (Acha e Szyfres, 1996).

Apesar de não haver estatísticas que quantifiquem as perdas econômicas impostas pela tuberculose bovina no Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). O programa foi criado com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (Brasil..., 2006).

O Brasil é detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo. O rebanho chegou a 209,5 milhões de cabeças em 2010, o que representou um aumento de 2,1% em relação ao ano de 2009, com maiores concentrações nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (Rebanho..., 2012).

A tuberculose bovina está disseminada por todo o território nacional, porém sua prevalência e distribuição regional não estão bem caracterizadas. Entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais da doença

indicaram uma prevalência média nacional de 1,3% (Brasil, 2006).

A implantação de programas como o PNCEBT é importante para o controle da tuberculose. Os países que tomaram tais ações sanitárias ao longo do século passado, com bases em tuberculinização e sacrifício de animais reagentes, conseguiram reduzir consideravelmente a frequência de animais infectados (Brasil..., 2006).

O teste imunológico indireto de tuberculinização é considerado o padrão-ouro para identificar animais tuberculosos (Bovine..., 2004). O diagnóstico confirmatório é feito após a morte do animal e requer o isolamento e a identificação do agente etiológico, *M. bovis*, um procedimento trabalhoso e demorado, que pode levar até 12 semanas (Corner, 1994). O isolamento, quando acompanhado de métodos moleculares como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), também tem se mostrado eficiente para o diagnóstico (Rodriguez *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, os avanços da biologia molecular vêm contribuindo com êxito no diagnóstico de enfermidades animais. O sequenciamento de DNA e a identificação de marcadores moleculares têm sido o foco deste desenvolvimento, possibilitando a padronização de técnicas moleculares, que permitem distinguir rapidamente espécies e também cepas da mesma espécie.

Com o advento das técnicas de tipificação molecular, houve grandes melhorias no conhecimento epidemiológico dos surtos da tuberculose bovina. Nos últimos anos, dados obtidos por estudos de epidemiologia molecular têm sido utilizados para informar, influenciar e monitorar as estratégias de controle e vigilância da tuberculose. Além disso, esses dados podem fornecer esclarecimentos sobre a dinâmica da população, pela comparação genética de isolados nas diferentes áreas geográficas e analisar mudanças evolutivas das populações dos patógenos (van Soolingen, *et al.*, 1999).

Existe uma variedade considerável de técnicas disponíveis para a tipagem dos membros do complexo *M. tuberculosis*, sendo as mais utilizadas o IS6110-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), o *Spoligotyping* (*Spacer oligonucleotide typing*) e o MIRU-VNTR (*Variable Number Tandem Repeat-Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*).

Os primeiros estudos sobre filogenia dos membros do MTBC foram realizados com base nos resultados obtidos da técnica IS6110-RFLP, padronizada em 1993 por van Embden e colaboradores (Foxman e Riley, 2001) e foi, há poucos anos, considerado padrão-ouro para tipificação de *M. tuberculosis*. No entanto, um número de limitações foi demonstrado para essa técnica, dentre elas, seu baixo poder discriminatório para isolados como o *M. bovis*, que apresentam poucas cópias de IS6110 (<6) em seu genoma e por não ser uma técnica suficientemente precisa para identificar algumas linhagens genéticas, ocasionando frequentemente o uso de uma tipagem secundária baseada em outro marcador genético (Kamerbeek *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2005).

O *spoligotyping* foi introduzido como um método rápido para determinar a epidemiologia molecular da tuberculose humana e como alternativa para a identificação de amostras com poucas cópias de IS6110 (Kamerbeek *et al.*, 1997). É uma técnica simples, rápida, reprodutível e que apresenta resultados estáveis, expressos em um padrão digital simples, que são facilmente nomeados e armazenados em banco de dados (Sola *et al.*, 1999). No entanto, alguns estudos demonstraram que somente o *spoligotyping* não seria suficiente para correlacionar epidemiologicamente cepas de *M. bovis*, especialmente porque todo o polimorfismo genético está restrito a um único *locus*, o agrupamento DR, havendo a necessidade de associações com outros métodos moleculares (Aranaz *et al.*, 1996).

O uso do método MIRU-VNTR também se mostrou aplicável para tipificação de

Mycobacterium bovis (Cowan *et al.*, 2002) apresentando alto poder discriminatório para cepas com poucas cópias de IS6110 quando comparado com a técnica IS6110-RFLP (Lee *et al.*, 2002). A tipificação de isolados de *M. bovis* pelo MIRU-VNTR detecta, a partir da verificação do tamanho dos produtos amplificados, em gel de agarose, o número de repetições nos *loci*. Outra possibilidade é a realização do MIRU de modo automatizado, usando iniciadores marcados com fluorescência (nesse caso, é indicado apenas para estudos com um elevado número de amostras, devido ao alto custo dos reagentes). Uma vantagem da automatização é a obtenção de resultados que são expressos como códigos numéricos, o que facilita a comparação e o intercâmbio de dados entre pesquisadores. No entanto, se faz necessária a amplificação de no mínimo 12 *loci* de MIRU, conforme descrito por Supply *et al.* (2000), para que os resultados sejam realmente discriminatórios em relação a outros métodos citados.

As análises de DNA de *M. bovis* têm oferecido respostas a muitas perguntas epidemiológicas, e sua ausência até os últimos 25 anos dificultaram em grande medida as investigações anteriores acerca da tuberculose bovina. Sem a tipificação de cepas, geralmente era impossível saber se a fonte provável de infecção por *M. bovis* em um rebanho foi animais do mesmo rebanho, animais de rebanhos adjacentes, novos animais que se encontravam temporariamente ou permanentemente em contato com o rebanho ou espécies de vida silvestre (Collins, 2011). A tipificação de isolados tem representado um importante papel nas análises sobre a dinâmica da população, e nos últimos anos, muitos países começaram a usar técnicas de tipificação e *M. bovis* como parte integrante do programa de controle da tuberculose bovina.

Dado que cada uma das técnicas citadas (*Spoligotyping*, IS6110-RFLP e MIRU-VNTR) apresentam, de alguma forma, algumas limitações, o emprego de vários métodos é necessário para se atingir maior poder discriminatório que irá fornecer dados

mais concretos acerca da tipificação, contribuindo dessa forma com a epidemiologia molecular do *M. bovis*.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a técnica *Multispacer Sequence Typing* (MST) para genotipagem de isolados de *Mycobacterium bovis*. A proposta da técnica é verificar a existência de polimorfismo alélico em diferentes *loci* do genoma de *M. bovis*, permitindo tipificar os isolados e criar perfis genotípicos que contribuam com estudos de prevenção, controle e epidemiologia. É uma técnica que demanda pequenas quantidades de DNA e que, por meio do uso do sequenciamento disponibilizam dados que, uma vez inseridos em bancos de dados públicos, irão contribuir com a genômica comparativa para obtenção de informações para estudos futuros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico e transmissão

A cepa infectante bovina é a mais patogênica entre as espécies do complexo *M. tuberculosis*. Apresenta uma das maiores gamas de hospedeiros de patógenos conhecidos, sendo capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem (O'Reilly e Daborn, 1995). Infecções por *M. bovis* também foram detectadas na fauna silvestre, o que pode acarretar graves consequências para os programas de controle e erradicação, uma vez que esses animais podem servir como reservatório do bacilo bovino. A principal forma de introdução da doença em um rebanho bovino é a aquisição de animais infectados (Belchior, 2001).

A doença é provocada por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo de 1 a 100 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfotintorial de álcool-ácido resistência (BAAR) a mais importante do gênero *Mycobacterium* (Manual..., 1994). Tal característica também está presente nas bactérias dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (Corrêa e Corrêa, 1992; Roxo, 1997).

O elevado conteúdo lipídico da parede celular do *M. bovis*, que pode atingir até 40% do peso seco das células, é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a indução da formação de granuloma, atividade adjuvante e antigenicidade. A tuberculose é provocada por micobactérias aeróbias ou microaerófilas e de modo geral as células apresentam crescimento lento. Esses bacilos são resistentes às ações de agentes químicos, mas sensíveis à ação de agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor (Manual..., 1994).

As rotas de infecção no gado são influenciadas por diversos fatores como idade, ambiente e práticas de higiene. O agente pode ser eliminado por diversas vias como o ar expirado, corrimento nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginais, uretrais e pelo sêmem (Neill *et al.*, 1994). O bovino, uma vez infectado pode transmitir a doença para outros animais, antes mesmo de apresentar lesões teciduais (Morris *et al.*, 1994).

Em estábulos, ao abrigo da luz, o bacilo da tuberculose bovina pode sobreviver por vários meses e nas pastagens pode chegar até dois anos. Infecta os animais independentemente da estação do ano, clima, sexo e região, e quanto mais tempo de vida tiver o animal, maior a probabilidade de contágio (Corrêa e Corrêa, 1992). A via pela qual os animais são infectados, a resposta imune do hospedeiro e a virulência do microorganismo são de grande importância para a sobrevivência, multiplicação e manifestação da doença no hospedeiro (Collins, 2001).

2.2. Epidemiologia e controle da tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma doença de alta relevância dentro do contexto da pecuária. Afeta diretamente a produtividade animal, influencia o comércio internacional de produtos de origem animal e, devido ao seu potencial zoonótico, é também considerado um grave problema de saúde pública (Cosivi *et al.*, 1999).

A introdução e a manutenção da doença em um rebanho são fortemente influenciadas por características da unidade de criação, entre as quais se destacam o tipo de exploração, o tamanho do rebanho, a densidade populacional e práticas zootécnicas e sanitárias. A alimentação de bezerras com leite de vacas tuberculosas e a aquisição de receptoras de embrião sem controle sanitário também constituem práticas comuns que podem introduzir a doença no rebanho (Manual..., 2009).

A ocorrência da infecção por *M. bovis* concentra-se principalmente nos países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em rebanhos leiteiros, mas também acomete rebanhos de corte. A identificação das fontes de infecção é feita por meio da implementação de uma rotina de testes tuberculínicos com abate de animais reagentes (Brasil..., 2006).

A tuberculose bovina é uma zoonose de ocorrência mundial com alta prevalência nos países em desenvolvimento e baixa prevalência em países desenvolvidos, devido a execução de programas de controle e erradicação realizados concomitantemente com inspeção de carnes e pasteurização de leite (Abrahão, 1998). Vale ressaltar que o leite e seus derivados não pasteurizados são considerados uma das principais fontes de transmissão da doença ao homem (Ashford *et al.*, 2001). Segundo Sinha (1994), 31,3% das vacas em lactação, que são reativas ao teste da tuberculina, eliminam o bacilo no leite, mas apenas 4% desses animais eliminam esse microrganismo em quantidade capaz de ser mensurada por cultura.

Os programas de controle e a erradicação da tuberculose bovina têm ganhado destaque mundial desde as décadas de 50 e 60 (Benet, 1994). Os métodos utilizados dependem de muitos fatores, mas o teste e a prática de sacrifício são os únicos meios pelos quais a erradicação definitiva é conseguida (Junior e Souza 2008).

Das nações atualmente reconhecidas como livres da tuberculose pode-se citar: Austrália, Islândia, Dinamarca, Suécia,

Noruega, Finlândia, Áustria, Suíça, Luxemburgo, Letônia, Eslováquia, Lituânia, República Checa, Canadá, Singapura, Jamaica, Barbados e Israel. Ainda que a tuberculose tenha sido eliminada na maior parte dos EUA, alguns rebanhos infectados continuam sendo relatados, acarretando periodicamente na perda do *status* de “livre da doença” em alguns estados americanos (Bovine..., 2007).

Das nações que já implantaram o programa, mas que ainda estão em fase de controle e erradicação, pode-se citar: Japão, Nova Zelândia, Estados Unidos, México, alguns países da América do Sul e América Central e outros países europeus. Casos particulares de animais de vida selvagem têm sido relatados em muitas regiões complicando os esforços na luta a favor da erradicação. Por exemplo: veado da calda branca (*Odocoileus virginianus*) no estado de Michigan nos Estados Unidos, texugos (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda e gambás (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia. A tuberculose bovina ainda é muito disseminada na África, partes da Ásia e em alguns países do Oriente Médio (Bovine..., 2007).

A tuberculose bovina é uma doença crônica que não apresenta sinais clínicos alarmantes como, por exemplo, aborto, febre alta e queda abrupta de produção presentes nas doenças de caráter agudo. Quando, por alguma razão, o criador é alertado para o problema da tuberculose e procura auxílio profissional, a prevalência no rebanho revela-se alta, de maneira geral (Brasil..., 2006).

A importância econômica atribuída à doença bovina está baseada nas perdas diretas resultantes da morte de animais, da queda no ganho de peso e diminuição da produção de leite, do descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico e condenação de carcaças no abate. Estima-se que os animais infectados percam de 10% a 25% de sua eficiência produtiva. Existe ainda a perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (Brasil..., 2006).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), reconhecendo essa enfermidade como destacado problema de saúde pública e animal. O programa foi criado com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (Manual..., 2006)

A estratégia de ação deste programa é clara: a certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas (de adesão voluntária) como um instrumento que os produtores e o setor agroindustrial podem utilizar para agregar valor aos seus produtos. Assim sendo, este não é um programa apenas do governo federal e dos governos estaduais, mais sim um projeto que envolve o setor produtivo e suas comunidades, o setor industrial e os consumidores, não esquecendo os médicos veterinários que atuam no setor privado. Em outras palavras, o setor público que atua como agente certificador dentro de um processo que envolve diretamente toda a cadeia produtiva (Manual..., 2006).

O Brasil é detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo. O rebanho nacional de bovinos em 2010 chegou a 209,5 milhões de cabeças, um aumento de 2,1% em relação a 2009, com maiores concentrações no Centro-Oeste, Norte e Sudeste (Rebanho..., 2012).

Atualmente, no país, existem três competências legais nas quais se exercem os serviços de inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal. O Serviço de Inspeção Federal (SIF), no qual registram-se os estabelecimentos que comercializam produtos entre Estados e/ou para exportação; o Serviço de Inspeção Estadual (SIE), no qual são registrados os estabelecimentos que comercializam produtos para outro município, e o Serviço de Inspeção Municipal (SIM) para os

estabelecimentos que comercializam produtos dentro do município. Vale lembrar, que somente obtendo a licença dos serviços de inspeções oficiais é que o produto poderá circular dentro da zona habilitada (Mudanças..., 2005).

A tuberculose bovina está disseminada por todo o território nacional, porém a sua prevalência e distribuição regional não estão bem caracterizadas. Entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais da doença indicaram uma prevalência média nacional de 1,3% (Brasil..., 2006). Um levantamento realizado em 1999 no Triângulo Mineiro e nas regiões do Centro e Sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo, foram detectados 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que esse valor subiu a 15% no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (Belchior, 2000). Ainda no estado de Minas Gerais foi realizado um estudo pra avaliar a prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em 11 matadouros sob Inspeção Federal no ano de 1993 a 1997. Nesse período foram abatidos 954.640 bovinos, foram diagnosticados 681 casos de tuberculose e constatou-se que a prevalência da enfermidade foi de 0,8% (Baptista *et al.*, 2004).

Na região Sul do Brasil, até a criação do PNCEBT, não houve estudos de prevalência da enfermidade especificamente. Havia apenas resultados de testes realizados por veterinários habilitados. Em 2008, houve um levantamento da frequência dos bovinos reativos ao teste intradérmico. Dados levantados no Paraná mostraram a aplicação do teste em 220.095 bovinos resultando em 496 casos de reatividade detectados em 225 focos. Em Santa Catarina, o teste ocorreu em 82.746 bovinos e resultaram em 853 animais reativos e 196 focos detectados. No Rio Grande do Sul, 60.628 bovinos foram testados e 738 animais foram reagentes; neste estudo o

número de focos não foi relatado (Manual..., 2009).

Em Alagoas, um estudo feito com 969 bovinos provenientes das regiões Leste, Agreste e Sertão do estado de Alagoas, revelou uma frequência de 4,64% de animais reativos. As regiões Leste, Agreste e Sertão apresentaram, respectivamente, frequências de 0,91%, 0,54% e 16,52% de bovinos positivos. O Sertão, caracterizado por concentrar a maioria dos municípios que constituem a bacia leiteira do estado de Alagoas foi apontado como a região de maior risco de transmissão do *M. bovis* (Silva *et al.*, 2011).

Um trabalho realizado recentemente no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) permitiu traçar o perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Brasil, com base nos resultados do diagnóstico bacteriológico relativos aos anos de 2004 a 2008. Amostras de lesões sugestivas de tuberculose foram coletadas durante a inspeção sanitária das carcaças em frigorífico/abatedouros ou na realização de necrópsias nas propriedades rurais, e foram procedentes em sua maioria, da região Sudeste do Brasil, sendo Minas Gerais responsável por praticamente todo o material encaminhado para diagnóstico. Os resultados indicaram que das 1021 amostras analisadas, somente 22,2% dos animais procedentes de matadouros sob inspeção sanitária ou estabelecimento de criação apresentaram histórico de algum exame de tuberculinização realizado, sendo o *M. bovis* isolado em 55,8% dos animais reativos no teste. O trato respiratório foi responsável pela maior parte das lesões sugestivas de tuberculose bovina, seguida por carcaça, cavidade abdominal, conjunto cabeça-língua e mama. O perfil dos bovinos que originaram as amostras remetidas ao laboratório foi composto, em sua maioria, por fêmeas de raças leiteiras com faixa etária acima de dois anos e meio. Das 871 amostras submetidas ao diagnóstico bacteriológico, 79,4% apresentavam lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina e 65,9% foram classificadas como *M. bovis* (Lopes Filho, 2010).

2.3. Genoma e Evolução do *Mycobacterium bovis*

A especificidade patógeno hospedeiro e a enorme similaridade genética das espécies que compõem o complexo *M. tuberculosis*, há muitos anos, tem levado pesquisadores de todo o mundo a buscar informações para obter uma melhor compreensão sobre a evolução deste grupo de microrganismos (Smith *et al.*, 2006). Os membros do MTBC podem ser diferenciados pela gama de hospedeiros, virulência e características fenotípicas, mas a base genética para essas diferenças continua desconhecida. Supondo que essas diferenças sejam oriundas de um ancestral comum, é intrigante observar que algumas espécies são patógenos exclusivos de humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*) ou de roedores (*M. microti*), enquanto outras infectam uma ampla gama de hospedeiros (*M. bovis*). Inicialmente, algumas hipóteses foram apresentadas com o intuito de compreender os processos evolutivos dos membros do MTBC (Garnier *et al.*, 2003).

Sreevatsan *et al.* (1997) propuseram que, devido ao elevado grau de conservação dos genes constitutivos (*housekeeping*), os membros do MTBC teriam sofrido um efeito de gargalo evolutivo (*evolutionary bottleneck effect*) ao mesmo tempo em que se separavam em espécies, evento que ocorreu há cerca de 15.000-20.000 anos. Stead *et al.* (1995) propuseram que, ao longo de muitos anos, a evolução de *M. tuberculosis* a partir de *M. bovis* ocorreu mediante adaptações específicas de um patógeno animal para um hospedeiro humano. Mas ambas as hipóteses foram propostas antes da disponibilidade de toda a sequência genômica de *M. tuberculosis* e antes que a genômica comparativa desvendasse várias regiões genômicas variáveis entre os membros do MTBC.

2.3.1. Genoma do *M. bovis*

M. bovis AF2122/97 é uma cepa altamente virulenta e foi isolada na Grã-Bretanha em 1997 (Gordon *et al.*, 1999). O sequenciamento do genoma completo

dessa cepa abriu portas para a obtenção de informações genéticas antes não disponíveis. O agente *M. bovis* possui 4.345.492 bp (pares de base) em seu genoma, organizado em um único cromossoma circular com conteúdo de guanina e citosina de 65 %, em média. Contém 3.952 genes, incluindo um profago e 42 elementos de inserção (*insertion sequence* -IS) (Garnier *et al.*, 2003).

O genoma de *M. bovis* é >99,95% geneticamente idêntico ao *M. tuberculosis*, mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. As diferenças são observadas na variação das redes de expressão gênica, fundamentais para muitas diferenças fenotípicas entre os bacilos da tuberculose. As paredes celulares das bactérias patogênicas mostram uma variação nas sequências de proteínas e na composição macromolecular, refletindo as pressões seletivas sobre estas estruturas. O maior grau de variação entre as sequências dos bacilos bovino e humano é encontrado em genes que codificam proteínas da parede celular e as proteínas secretoras (Garnier *et al.*, 2003).

Apesar da similaridade genética com *M. tuberculosis*, o genoma do *M. bovis* tem sido reduzido devido a deleções, eventos considerados únicos e unidirecionais nessas bactérias. Garnier *et al.* (2003) demonstraram que a supressão da informação genética é importante na representação do genoma e que o *M. bovis* não apresenta genes únicos quando comparado com outros membros do MTC.

O crescente número de projetos de sequenciamento de genomas levou investigadores de todo o mundo a apresentar o uso de bancos de dados como uma ferramenta rápida e conveniente para armazenar e comparar sequências, permitindo dessa forma, selecionar genes potenciais para o diagnóstico de agentes. O GenBank, dispõe de informações úteis que tem contribuído com o desenvolvimento da genômica comparativa, explorada no âmbito de investigação sobre doenças infecciosas, na compreensão de relações filogenéticas e

processos evolutivos que atuam sobre o genoma.

Atualmente a pesquisa sobre a evolução e epidemiologia molecular do complexo *M. tuberculosis* tem sido feita explorando múltiplos marcadores tais como as Regiões de Diferença (*Direct repeats* - DR), Sequências de Inserção (IS), Sequências Repetidas em Série de Número Variável (VNTR), Sequências Exatas em Tandem (ETR), Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), entre outros. Alguns desses marcadores tiveram uma importante contribuição no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, enquanto outros foram utilizados no desenvolvimento de métodos de tipificação e estudos de relações filogenéticas.

2.3.2. Estrutura da população do *M. bovis*

Smith *et al.* (2003) descreveram a população de *M. bovis* como sendo uma população de estrutura irregular e não uniforme, que consiste em uma série de grandes e pequenos complexos clonais. Complexos clonais são definidos como grupos de cepas descendentes de uma única célula que foi o ancestral comum mais recente desse complexo clonal, e que apresenta todas as características derivadas do ancestral comum mais recente (Smith, 2011). Para as bactérias, que não apresentam a sua diversidade limitada pela reprodução sexuada, a diversidade genética pode ser decorrente de eventos como a recombinação genética, translocações, duplicações ou inversões. No entanto, foi observado que nos membros do MTBC não houve nenhuma troca de material genético entre linhagens (Smith *et al.*, 2011).

As taxas muito baixas de homoplasias (mutações idênticas em diferentes linhagens) e a congruência entre os diferentes marcadores moleculares encontrados a partir de reconstruções filogenéticas dos membros do MTBC foram observadas como uma consequência de clonalidade (Comas e Gagneux, 2009). Isso é esperado em um organismo clonal porque as homoplasias só podem ser geradas por recombinação de material genético entre

diferentes linhagens ou por eventos independentes, como mutações repetidas no mesmo *locus* (Maynard Smith e Smith, 1998).

A baixa diversidade de sequências dentro do MTBC sugere que homoplasias causadas por mutações repetidas não são susceptíveis de serem observadas, a não ser que o *locus* esteja evoluindo sob alguma forma de pressão seletiva, por exemplo, genes que conferem resistência a antibióticos, ou se um evento de mutação gerar alelos similares em diferentes linhagens (e.g., *loci* VNTR) (Smith, 2011).

A alta frequência com que alguns clones se originam na população pode ser explicada, principalmente, pela seleção. No entanto, a irregularidade observada na estrutura global da população de *M. bovis* e o domínio de clones individuais poderiam ser o resultado de um efeito fundador recente, ou seja, um clone sendo introduzido em um novo habitat e multiplicando-se na ausência de competição. Se todas as cepas tivessem oportunidades iguais de sobrevivência, então a estrutura da população em geral seria relativamente uniforme, com poucas divisões filogenéticas (Smith *et al.*, 2003).

Cohan *et al.* (2002) sugerem que os atributos mais importantes das espécies são que a divergência dentro da espécie está limitada por alguma força coesiva, que essa divergência é irreversível e que as diferentes espécies são ecologicamente distintas. Para as bactérias, a força coesiva que provoca essa divergência dentro de um grupo, os ecotipos, é a pressão seletiva. Um novo ecotipo evolui quando uma cepa se adapta a um novo nicho e se converte imune a pressão seletiva da população ancestral.

Embora os ecotipos não sejam reconhecidos como um rank oficial da taxonomia bacteriana (Brenner *et al.*, 2005) o seu conceito é importante para os estudos de microevolução, já que descreve uma coleção de cepas que mostram um certo nível de diferenciação ecológica dentro da sua espécie (Schloter *et al.*, 2000). Os ecotipos preservam a completa ou quase

totalidade do potencial fenotípico e ecológico que caracteriza a espécie, sendo capazes de explorar apenas um nicho ecológico ligeiramente diferente em comparação com suas espécies.

Smith *et al.* (2006) observaram que os membros do MTBC podem infectar uma série de grupos de hospedeiros adaptados que se enquadram no conceito de ecotipo proposto por Cowan *et al.* (2002). Cada ecotipo tem preferência por um hospedeiro distinto, representando o seu nicho, e marcados por diferenças moleculares fixas dentro de cada ecotipo.

2.3.3. Filogenia do *M. bovis*

Os primeiros estudos filogenéticos das micobactérias foram realizados inicialmente com base em similaridades fenotípicas (Bergey *et al.*, 1923, citado por Tortoli, 2011). O gene 16S RNA foi o primeiro, e durante muitos anos, o único alvo de sequenciamento genético em bactérias. Sua função essencial da síntese de proteínas tem estado presente em todos os organismos desde o início da evolução (Peix *et al.*, 2009). Um enorme salto qualitativo ocorreu a partir da década de 60, com o enorme progresso do conhecimento genético e mais recentemente com a criação de bancos de dados de domínio público, que armazenam em tempo real, sequências genéticas em toda parte do globo (Tortoli, 2011).

Após a conclusão do sequenciamento do genoma completo da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, foi possível realizar comparações *in silico* do genoma, e a partir daí identificar diversos marcadores genômicos que pudessem contribuir com a análise evolutiva e com estudos epidemiológicos acerca dos membros do complexo *M. tuberculosis*.

Elementos repetitivos e deleções específicas em regiões cromossômicas, identificadas como regiões de diferença ou polimorfismo de longas sequências (LSP), têm sido utilizados com sucesso para determinar as relações filogenéticas entre os membros do complexo *M. tuberculosis*

(Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006).

2.3.3.1. Regiões de diferença (RD)

Um importante trabalho desenvolvido por Brosch *et al.* (2002) propôs um novo cenário evolutivo para os membros do MTBC e revelou 20 regiões de diferença no genoma dessas espécies. Catorze delas denominadas RD1-RD14 apresentaram uma variação de tamanho entre 2 a 12,7 kb e se mostraram ausentes no bacilo Calmette-Guérin Pasteur quando comparadas com a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Seis delas denominadas RvD1-RvD5 e TbD1 se mostraram ausentes na cepa H37Rv quando comparadas com outros membros do complexo.

O ensaio foi realizado pela técnica da PCR utilizando 100 cepas e contou com amostras representativas de *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. canneti*, o bacilo Calmette-guérin (BCG) e *M. tuberculosis*. Três tipos de deleções entre as 20 regiões reveladas foram determinadas e apresentaram sua importância como marcadores evolutivos (Brosch *et al.*, 2002).

O primeiro marcador evolutivo, inclui elementos genéticos móveis como profagos phiRv1 (RD3) e phiRv2 (RD11) e sequências de inserção IS1532 (RD6) e IS6110 (RD5), cuja distribuição no bacilo da tuberculose foi altamente divergente. O segundo tipo de deleção é mediado por recombinação homóloga entre elementos de inserção IS6110 adjacentes resultando na perda do segmento de DNA interveniente (RvD2, RvD3, RvD4 e RvD5), sendo variável de cepa para cepa. O terceiro e último tipo inclui exclusões cuja fronteira com as regiões genômicas normalmente não apresentam sequências repetitivas. Muitas vezes essas deleções ocorrem em regiões codificadoras, resultando no truncamento de genes que ainda estão intactos em outros membros do complexo. As regiões RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD14 e TbD1 são representantes deste terceiro grupo (Brosch *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados para *M. tuberculosis* mostraram que as RD citadas no terceiro grupo são altamente conservadas, e que essas RD podem ser utilizadas para diferenciar o bacilo humano independente da sua origem geográfica e sugere que essas regiões podem estar envolvidas na especificidade do seu hospedeiro (Brosch *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados para *M. bovis* indicaram uma variabilidade das regiões RD suprimidas em função dos diferentes hospedeiros que são susceptíveis ao bacilo bovino. Com exceção dos profagos, a cepa clássica de *M. bovis* ficou caracterizada pela deleção de oito RD (RD4, RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 e RD13). Em contrapartida, as regiões RvDs se mostraram altamente conservadas e o TbD1 se mostrou presente em todos os isolados de *M. bovis* (Brosch *et al.*, 2002).

Curiosamente, as cepas de *M. bovis* clássicas isoladas da Argentina, Holanda, Reino Unido e Espanha, bem como *M. bovis* isolado de humanos, mostraram o maior número de deleções RD (RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 e RD13) e parecem ter sofrido maior perda de DNA quando comparadas com outros membros do complexo (Brosch *et al.*, 2002).

A análise das cepas *M. bovis* BCG indicaram as mesmas deleções da cepa clássica de *M. bovis*, no entanto outras três deleções foram reveladas (RD1, RD2 e RD14). Sugere-se que este evento tenha ocorrido durante e após o processo de atenuação da cepa (Brosch *et al.*, 2002). A atual vacina BCG foi derivada de uma cepa de *M. bovis* que foi atenuada por uma série de passagens em meio de cultura específico. No entanto, depois de quase 50 anos de seu uso, a base genética para as diferenças fenotípicas com o bacilo da tuberculose é em grande parte desconhecida (Fine, 1994).

O *M. bovis* fica classificado como o último membro de uma linhagem separada representada por *M. africanum* (RD9) e *M. microti* (RD7, RD8, RD9 e RD10) e teria se ramificado do progenitor *M. tuberculosis*,

representante exclusivo da RD9. As deleções observadas características de cada espécie podem ter contribuído para a expansão clonal e o aparecimento de patógenos mais bem sucedidos em novos hospedeiros. Os resultados levaram a proposta de um novo cenário evolutivo para os membros do complexo e identificou o *M. tuberculosis* ou o *M. canneti* como a espécie mais estreitamente relacionada com o ancestral comum do bacilo da tuberculose (Brosch *et al.*, 2002).

2.3.3.2. Elementos móveis (IS)

A maioria das mudanças encontradas no genoma dos membros do MTBC está associada a elementos móveis conhecidos como sequências de inserção (IS), constituídas por fragmentos pequenos de DNA capazes de se auto-inserir dentro do genoma das bactérias, conferindo polimorfismo entre as cepas (Brosch *et al.*, 2002 e Amadio *et al.*, 2005).

Estudos realizados revelaram seis tipos de IS que se mostraram ativos e com capacidade de se transpor de um local para outro no DNA da bactéria. O elemento móvel mais observado foi a IS6110, um transposon exclusivo do complexo *M. tuberculosis*, representado por uma sequência de 1.361 pb, que pode ser encontrado em grande variedade de número de cópias (0 a 25) e em diferentes posições no genoma, de acordo com a espécie. Essa descoberta tornou possível o desenvolvimento de uma técnica de tipificação que introduziu os primeiros estudos sobre a filogenia do MTBC. O método, padronizado em 1993 por van Embden e colaboradores é conhecido como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e foi até poucos anos considerado padrão-ouro para genotipagem de *M. tuberculosis*. No entanto, a técnica revelou baixo poder discriminatório para isolados de *M. bovis*, caracterizados por apresentar um baixo número de cópias de IS6110 (<6) (van Embden *et al.*, 1993).

2.3.3.3. Sequências repetitivas DR (*Direct Repeat*)

O elemento DR identificado por Hermans *et al.*, em 1991, revelou o *locus* DR, composto de pequenas sequências repetidas de 36 bp que se intercalam com pequenas sequências espaçadoras variáveis, que podem conter de 34 a 41 bp. Dois anos mais tarde, foi observada a natureza polimórfica desse *locus*, o que levou ao desenvolvimento subsequente do método *Spoligotyping*, que baseado na variabilidade da DR introduziu conceitos e ferramentas mais modernas para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis* (Groenen *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997). O polimorfismo entre os isolados é determinado pela ausência ou presença de um ou mais espaçadores (Aranaz *et al.*, 1996).

A técnica do *spoligotyping* permite a tipificação dos membros do MTBC, sendo nos dias de hoje, considerada a padrão-ouro para genotipagem dessas espécies. Sua aplicação tem sido muito útil na determinação de complexos clonais de *M. bovis*. Os padrões do *spoligotyping* mudam lentamente, permitindo aos investigadores, a partir desta técnica, analisar a estrutura e a história da população. No entanto, a perda de um espaçador pode ocorrer de forma independente em linhagens autônomas devido à ocorrência de homoplasia e pode, equivocadamente, identificar membros de um complexo clonal (Smith *et al.*, 2006).

A idoneidade de uma deleção como um marcador filogenético depende da estabilidade e da constituição da região genômica afetada; as exclusões em regiões com elevada taxa de mutação, que podem estar sujeitas à deleção, tais como regiões com genes não essenciais (não codificantes) ou com DNA repetitivos não são indicadas como um alvo ideal (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011).

Um trabalho realizado por Smith *et al.* (2003) contou com a análise de 11.500 isolados de *M. bovis* na Grã-Bretanha (Inglaterra, País de Gales e Escócia) pela

técnica do *spoligotyping*. O foco do estudo foi avaliar a expansão clonal dessa espécie na região. Sabendo que as trocas de material genético entre os membros do complexo é um evento raro, os autores contaram com a hipótese de que os padrões do *spoligotipo* apresentam sinais filogenéticos suficientes para reconstruir eventos evolutivos recentes com alguma confiança. As cepas com um mesmo padrão de *spoligotipo* apresentam-se como um conjunto de cepas derivadas da replicação clonal recente de uma única célula ancestral. Dado que os padrões do *spoligotipo* mudam lentamente, foi utilizado o VNTR como um segundo sistema genético, uma vez que o polimorfismo nos *loci* VNTR muda rapidamente e pode ser altamente variável dentro de um grupo de células que apresentam o mesmo padrão no *spoligotipo*. Foi concluído que a distribuição do número variável de repetições em *tandem* dos tipos clonais mais comuns é incompatível com a mutação aleatória e a deriva genética, uma vez que esses padrões de VNTR tendem a ser gerados por homoplasia ou por pressão seletiva. Foi explicado em primeiro lugar que de tempos em tempos um genótipo VNTR especial aumenta drasticamente sua frequência. Se uma mutação favorável ocorre seletivamente em qualquer lugar do genoma, aumentará a frequência do *spoligotipo* e do tipo VNTR da cepa que apresenta a mutação seletiva favorável. Uma segunda explicação é a oportunidade ecológica, quando uma nova região geográfica é invadida por novas espécies hospedeiras e na ausência de competição, o genótipo se torna comum (Smith *et al.*, 2003).

Smith *et al.* (2006) realizaram um trabalho utilizando dados dos padrões de *spoligotipo* para investigar a perda de unidades espaçadoras nas cepas que apresentaram a região cromossômica RD9 deletada descrita por Brosch *et al.* (2002). Foi observada a perda de alguns espaçadores (3, 9, 16, 39 e 40-43), de modo que os padrões do *spoligotipo* definiram uma série de grupos de bactérias que foram organizadas em clados.

Estudos que segregam *M. bovis* em clados são importantes porque o reconhecimento de subpopulações ou clones específicos com características genéticas únicas ou padrões clínicos particulares podem melhorar o entendimento acerca das vantagens adaptativas de algumas linhagens e de funções de genes específicos na patogenicidade, além de auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o combate à tuberculose bovina (Rodwell *et al.*, 2008).

2.4. Complexos clonais de *M. bovis*

Embora a tuberculose bovina tenha sido relatada em todos os continentes onde há criação de gado, ficou assumido que este patógeno se originou em um lugar, de uma só vez, e desde então tem sido distribuído em todo o mundo (Smith *et al.*, 2011).

Alguns complexos clonais de *M. bovis* foram definidos pela presença de deleções específicas, cada uma com o seu padrão específico do espoligotipo. Dois estão geograficamente localizados na África (RDAf1 e RDAf2) e um terceiro apresenta distribuição global (RDEu1). Em ambos os estudos realizados, o *spoligotyping* foi realizado inicialmente como um *scanner* para identificar os membros de cada complexo clonal. O complexo clonal Af1 (dominante em Camarões, Nigéria, Mali e Chade) e o complexo Af2 (frequente na África Oriental) foram identificados por Berg *et al.* (2011) e Muller *et al.* (2009) e o complexo clonal Eu1 (frequente na República da Irlanda, Reino Unido e em países de outros continentes) foi identificado por Smith *et al.* (2011).

Todos os membros do complexo clonal Af1 foram identificados pela deleção cromossômica específica (RDAf1) e pela ausência do espaçador 30 no *spoligotyping*. As cepas de complexo clonal Af1 foram frequentemente encontradas e mostraram a deleção cromossômica RDAf1 em 96% de um total de 300 amostras de *M. bovis* analisadas em Mali, Camarões, Nigéria e Chade. Em outros países da África como Argélia, Burundi, Etiópia, Madagascar, Moçambique, África do Sul, Tanzânia e

Uganda a deleção não foi observada. Utilizando uma combinação do VNTR com o *Spoligotyping* foi possível mostrar que a população de *M. bovis* em cada uma dessas regiões é diferente, sugerindo que uma mistura recente de estirpes entre os países não é comum nessa área da África. Além disso, o padrão do espoligotipo não foi identificado nas amostras da Europa, Irã e América do Sul, sugerindo que o Af1 está geograficamente localizado (Muller *et al.*, 2009).

Já o complexo clonal Af2 de *M. bovis* foi definido pela deleção cromossômica RDAf2 e pela associação com a ausência dos espaçadores 3-7 no padrão de espoligotipo. O Af2 foi identificado com alta frequência em isolados de *M. bovis* em Uganda, Burundi, Tanzânia e Etiópia. As análises para detecção da deleção cromossômica RDAf2 realizadas na Argélia, Mali, Chade, Camarões, África do Sul e Moçambique não identificou nenhuma cepa do complexo clonal Af2, o que sugere que este complexo clonal está localizado na África Oriental. A ausência dos espaçadores 3-7 foi raramente observada entre os isolados fora da África e os poucos isolados detectados apresentaram a RDAf2 intacta. Um dado interessante observado foi que os membros do Af2 de *M. bovis* apresentaram em sua maioria quatro ou mais cópias da IS6110, em contraste com a maioria das outras cepas que possuem apenas uma ou poucas cópias. A deleção RDAf2 se mostrou intacta nas cepas do complexo clonal Af1, assim como a deleção RDAf1 se mostrou intacta para as linhagens Af2, permitindo concluir que as cepas dos complexos clonais Af1 e Af2 são mutuamente exclusivas e não compartilham qualquer história filogenética com o ancestral comum mais recente de cada complexo clonal, sugerindo que a mistura entre as populações de bovinos nesses países é pouco frequente (Berg *et al.*, 2011 e Smith *et al.* 2011).

Um terceiro complexo clonal denominado Eu1 foi marcado pela exclusão da região cromossômica RDEu1. O complexo foi identificado pela análise de padrões de espoligotipo disponíveis no banco de dados de *M. bovis* (www.mbovis.org). Mais de

1000 estirpes provenientes de mais de 30 países foram analisadas. Inicialmente os dados mostraram que os isolados da República da Irlanda e do Reino Unido estão intimamente relacionados, e mais de 99% das cepas apresentaram a deleção RDEu1. Dos 452 isolados de *M. bovis* e outros animais na República da Irlanda, um total de 20 padrões de espoligotipo foram identificados pela ausência do espaçador 11 e este se mostrou ausente em 99% dos isolados. O complexo clonal Eu1 se fez presente em menos de 14% dos isolados de *M. bovis* na França, Espanha e Portugal e se mostrou raro em outros países da Comunidade Européia e no Irã. No entanto, foram encontradas com alta frequência em países que tiveram relações comerciais de gado com o Reino Unido (EUA, África do Sul, Nova Zelândia, Austrália e Canadá). Nas Américas, com exceção do Brasil, o Eu1 foi encontrado com alta frequência na Argentina, Chile, Equador e México, bem como América do Norte. Uma pequena parte das cepas de Taiwan não foi incluída no complexo clonal Eu1, mas surpreendentemente os isolados da Coreia e do Cazaquistão foram enquadrados no Eu1. A explicação mais simples para a distribuição desse complexo clonal é que ele foi disseminado por bovinos infectados do Reino Unido a antigos parceiros comerciais, embora não haja evidência de dispersão secundária desde então. Essa foi a primeira identificação de um complexo clonal de *M. bovis* disperso globalmente que tenta explicar a grande parte da distribuição atual global deste importante patógeno veterinário que parece ser resultado do recente comércio internacional de gado (Smith *et al.*, 2011).

Um quarto complexo clonal Eu2 também foi identificado. Ao contrário dos outros já mencionados, este complexo foi definido pela ausência do espaçador 21 associado a um SNP no gene *guaA*. Os isolados de *M. bovis* membros do Eu2 são provenientes da Península Ibérica onde são encontrados com alta frequência, enquanto na França, Itália e Ilhas Britânicas eles existem, mas em uma frequência muito baixa. Estudos anteriores revelaram que as cepas de *M. bovis* em Portugal (Duarte *et al.*, 2008) e na

Espanha (Rodriguez *et al.*, 2010) foram caracterizadas pela ausência do espaçador 21 em 70% das amostras, enquanto na França e na Itália o padrão encontrado para o *spoligotyping* foi o SB0120 (BCG-like) (Haddad *et al.*, 2001 e Boniotti *et al.*, 2009). A mutação no gene *guaA* não foi observada nas cepas de referência dos três complexos clonais descritos anteriormente (AF1, AF2 e Eu1), sugerindo que o Eu2 identifica um quarto complexo clonal de importância global.

Em resumo, o MTC é um grupo altamente clonal de cepas (Smith *et al.*, 2006) e a diversidade genética entre os seus membros podem em parte ser causadas por exclusões que deverão representar eventos genéticos (Gordon *et al.*, 1999). Essas exclusões denominadas polimorfismos de sequências longas têm sido exploradas na intenção de criar um novo cenário evolutivo para o MTBC, baseado em regiões de diferença (Brosch *et al.*, 2002). Os SNPs também têm sido utilizados, porém com uma aplicação mais direcionada para estudos de filogenia (Gutierrez *et al.*, 2005 e Smith *et al.*, 2006).

Análises acerca dos complexos clonais de *M. bovis* representam atualmente, uma nova ferramenta para a interpretação e exploração em massa de dados gerados constantemente na rotina de epidemiologistas moleculares, e ainda, permite criar hipóteses para investigar a distribuição demográfica e a patogenicidade deste importante patógeno veterinário de importância global (Smith *et al.*, 2006).

2.5. Diagnóstico

Para realização do diagnóstico da tuberculose pode-se recorrer aos métodos clínicos, alérgicos, bacteriológicos, sorológicos e/ou anatomopatológicos (Rosenberger, 1989) e moleculares.

O método diagnóstico *in vivo* preconizado para bovinos e prescrito para o comércio internacional é o teste de tuberculina. O teste consiste em provas cutâneas indiretas realizadas pela inoculação intradérmica do PPD (Derivado Protéico Purificado), um

extrato de antígenos de *M. bovis*, com detecção de inchaço local causado pela hipersensibilidade retardada após 72 horas da inoculação (Tschopp et al., 2009).

O teste envolve a inoculação intradérmica de tuberculina bovina e tuberculina aviária e é utilizado para diferenciar os animais infectados com *M. bovis* e os responsáveis pela resposta à tuberculina bovina, como resultado da exposição a outras micobactérias. Esta sensibilização é atribuída a antígenos de reatividade cruzada entre as espécies de micobactérias e gêneros relacionados (Tschopp et al., 2009).

No exame *post mortem*, estudos bacteriológicos e histopatológicos das lesões macroscópicas permitem controlar o diagnóstico realizado em campo e avaliar a eficácia das provas tuberculínicas (Organización Mundial de la Salud, 1995).

O exame histopatológico pode aumentar a confiança do diagnóstico, mas apenas o isolamento bacteriológico do *M. bovis* fornece um diagnóstico positivo. Entretanto, o longo tempo requerido para o isolamento e identificação do *M. bovis* faz com que, nos locais onde a prevalência da doença é alta, a cultura não seja solicitada, baseando-se o diagnóstico apenas nas lesões macroscópicas encontradas durante o exame *post mortem* (Brasil..., 2006).

A bacteriologia clássica é considerada padrão-ouro no diagnóstico de *M. bovis*. No entanto, os métodos utilizados para descontaminação do material comprometem a sensibilidade. Além de destruir os contaminantes, podem eliminar alguns bacilos, dificultando o seu isolamento. Também demandam uma grande quantidade de bacilos viáveis (Zanini et al., 2001), atrasando muitas vezes o diagnóstico devido ao crescimento lento característico das micobactérias do MTC (Haddad et al., 2004).

Métodos de biologia molecular estão sendo desenvolvidos para detectar diretamente o agente em amostras clínicas, para identificar o agente isolado pelos métodos clássicos

de bacteriologia e para avaliar a variação genética dentro de uma espécie de micobactéria (Brasil..., 2006).

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem obtidas através de métodos laboratoriais convencionais (Supply et al., 2000, Supply et al., 2001).

O diagnóstico precoce é essencial para o controle da doença. A diferenciação das espécies do MTBC depende de características fenotípicas, mas devido à alta homologia do genoma, a identificação precisa de certas espécies se torna trabalhosa e difícil (Eisenach et al., 1990).

A PCR tem sido cada vez mais utilizada como uma alternativa rápida e sensível para o diagnóstico da tuberculose. A diferenciação precisa dos membros do MTC é clinicamente importante, devido às diferentes resistências naturais que cada espécie apresenta para medicamentos antituberculose e ainda contribui com informações epidemiológicas precisas que permitem monitorar e rastrear os focos propulsores da infecção (Reddington et al., 2011).

2.6. Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O advento de novas técnicas em biologia molecular tem favorecido o aumento das investigações sobre etiologia, detecção e epidemiologia das doenças infecciosas (Baptista, 2001).

A aplicação da genotipagem tem contribuído no esclarecimento da estrutura clonal do complexo *M. tuberculosis*, que se constitui de distintas linhagens filogenéticas caracterizadas pelas diferenças em suas distribuições geográficas, imunogenicidades, virulência e associações com tuberculoses multidroga-resistentes (Supply et al., 2003).

Os métodos de genotipagem moleculares mais comuns recorrem à amplificação por PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem de marcador epidemiológico, mas com potencial polimorfismo para diferenciar estirpes sem relação epidemiológica entre si. No caso dos membros do MTBC, estas técnicas incluem o IS6110-RFLP, o *Spoligotyping* (de "spacer", "oligonucleotide" e "typing") e a análise de MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeats*) (Duarte *et al.*, 2007).

2.6.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Van Embdem *et al.* publicaram um protocolo padrão no ano de 1993, aceito internacionalmente, para tipificar isolados de *M. tuberculosis*, avaliando a presença da sequência de inserção IS6110 pela detecção do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP). A IS6110 é um transposon exclusivo do complexo *M. tuberculosis*, representado por uma sequência de 1.361 pb, que pode ser encontrado em grande variedade de número de cópias (0 a 25) e em diferentes posições no genoma, de acordo com a espécie (Van Embdem *et al.*, 1993). O perfil encontrado em cada isolado é determinado pelo padrão de bandas eletroforéticas geradas em gel de agarose (Foxman e Riley, 2001).

Apesar de o seu alto poder discriminatório, esta técnica apresenta algumas complicações como a necessidade de uma grande quantidade de DNA, mão-de-obra intensiva e qualificada, possíveis erros na interpretação dos resultados e por ser um método baseado em gel (Soolingen, 2001). Adicionalmente, não tem poder de discriminação suficiente para cepas como o *M. bovis*, que apresentam poucas cópias de IS6110 (<6); o que é parcialmente superado usando métodos adicionais de tipagem, tais como *spoligotyping* (Cowan *et al.*, 2005).

O RFLP introduziu os primeiros estudos sobre filogenia dos membros do MTBC e

tem sido utilizado por muitos pesquisadores em uma variedade de questões epidemiológicas, tais como confirmação de surtos em instituições, identificação de surtos esporádicos de tuberculose, avaliação de fatores de risco para infecções recentes ou doenças em progressão rápida, rastreamento e distribuição geográfica de cepas e avaliação de contaminação laboratorial cruzada com o *M. tuberculosis* (Foxman e Riley, 2001).

2.6.2. Spoligotyping

A tipagem pelo *spoligotyping* baseia-se na amplificação por PCR do DNA presente no *locus* denominado de região de repetição direta (*Direct Repeat* – DR), presente exclusivamente no genoma de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (Kamerkeek *et al.*, 1997).

O elemento DR foi identificado por Hermans *et al.* em 1991. O *locus* DR, que caracteriza a técnica do *spoligotyping*, é composto de pequenas sequências repetidas de 36 bp que se intercalam com pequenas sequências espaçadoras variadas, que podem conter de 34 a 41 bp. A associação de um espaçador e uma sequência contínua DR é chamada DVR (Hermans *et al.*, 1991).

A ordem dos espaçadores é aproximadamente a mesma em todos os isolados, a diferença está na ocorrência de inserções e deleções dos espaçadores, de modo que o polimorfismo de vários isolados pode ser comprovado com base na presença ou ausência de um ou mais espaçadores (Aranaz *et al.*, 1996). O número de DRs varia entre as espécies do complexo *M. tuberculosis* e no *M. bovis* caracterizam-se pela ausência das sequências espaçadoras 3, 9, 16 e 39 a 43 (Kamerbeek *et al.*, 1997).

A técnica do *spoligotyping* é uma técnica de hibridização de linha reversa em *blot* (Haddad *et al.*, 2004) e envolve duas etapas. A primeira consiste na amplificação, por PCR, dos espaçadores presentes entre as regiões DR. Uma das vantagens desta técnica é que somente um par de iniciadores, *a* e *b*, específico às duas

extremidades das sequências DR, são necessários para amplificar todos os espaçadores presentes. O iniciador *a* está ligado a uma enzima, a fim de permitir a detecção dos produtos amplificados. O objetivo da segunda etapa é revelar quais espaçadores foram amplificados nos isolados que estão sendo analisados. Esta etapa envolve a hibridização dos espaçadores a uma membrana usando um *miniblotter*. Nesta membrana, oligonucleotídeos correspondentes aos diferentes espaçadores estão covalentemente ligados. Os produtos amplificados são depositados nos ângulos certos nas linhas dos oligoespaçadores e a presença de um espaçador é revelada por um ponto de inserção dos oligonucleotídeos e as linhas de amplificação usando um método químico. No *spoligotyping* convencional, usando o *minoblotter*, até 45 isolados podem ser comparados ao mesmo tempo (Aranaz *et al.*, 1996, Cousins *et al.*, 1998, Haddad *et al.*, 2004).

O *spoligotyping* fornece um sistema de tipificação que pode ser utilizado em um grande número de isolados e os resultados podem ser apresentados de uma forma binária padronizada; o que foi uma grande vantagem sobre as outras técnicas, uma vez que permitiu pela primeira vez a realização da comparação de resultados entre laboratórios (Smith, 2003). A criação de bancos de dados com perfis genotípicos dos membros do MTBC denominados espoligotipos tem facilitado a comparação dos perfis genotípicos encontrados nas diferentes regiões do mundo, permitindo uma melhor compreensão da dinâmica da doença (Filliol *et al.*, 2002). Estes bancos contêm uma distribuição global e filogenética dos espoligotipos mundiais (Sola *et al.*, 2001).

A técnica é rápida, de baixo custo, e permite detectar e tipificar simultaneamente os membros do MTBC. Também permite distinguir especificidades geográficas entre os seus espoligotipos, de modo que alguns isolados agrupados em famílias possam ser relacionados a uma determinada população, região geográfica e até a própria história da

dispersão da tuberculose no mundo (Sola *et al.*, 1999).

2.6.3. VNTR (Variable Number Tandem Repeat)

Os VNTR estão presentes nas regiões intergênicas e não intergênicas do genoma, de modo que podem interferir nos processos de regulação da célula. Possuem funções nas trocas moleculares nos organismos, na regulação da transcrição e possivelmente na tradução (van Belkum, 1999). A tipificação pelo VNTR é realizada com base no polimorfismo dos números de sequências repetitivas organizadas em *tandem* no DNA. (van Belkum *et al.*, 1998).

Sequências repetitivas em tandem foram observadas pela primeira vez no genoma de eucariotos. Sua distribuição no genoma se mostrou bastante dispersa e as sequências foram relatadas com um grande número de cópias. Os *loci* com pequenas sequências repetidas de 1-13 bp foram identificados como microsatlélites e aqueles com sequências repetidas de 10-100 bp como minisatlélites (Tautz e Renz, 1984; Tautz e Schlotterer, 1994). Muitos desses *loci* possuem hipervariabilidade em seus números de repetições em humanos e animais, o que levou a denominação de *loci* VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (Nakamura *et al.*, 1987).

O método tem como base a amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos para as regiões flangeadoras dos VNTR e a determinação dos tamanhos dos produtos de PCR, que refletem os números de cópias das VNTR amplificadas (Frothingham e Meeker-O'Connell, 1998). Os produtos amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose, o tamanho dos fragmentos é verificado, e posteriormente é calculado o número de alelos. O polimorfismo nos *loci* do tipo repetição em *tandem* pode ocorrer como uma variação no número de unidades repetidas ou como uma mudança de nucleotídeos, gerando em ambos os casos uma variação alélica (van Belkum *et al.*, 1998). Os resultados podem ser observados em um formato numérico

simples, adequado para o estudo da epidemiologia molecular e agentes infecciosos (Frothingham e Meeker-o'Connell, 1998).

Em 1997, Supply *et al.* identificaram 29 *loci* presentes no genoma dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que denominaram de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU), sendo estes similares às sequências de minisatélites descritas no genoma humano. Em 2000, Supply *et al.* pesquisando o genoma da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), identificaram 12 novos *loci* em adição aos 29 identificados anteriormente (Supply *et al.*, 1997), totalizando 41 locais em todo o cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv, sendo que desses, 12 exibiram polimorfismos no número de cópias entre isolados não relacionados de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2000).

No decorrer dos anos outros trabalhos foram realizados e segundo Price-Carter *et al.* (2011) o número de marcadores utilizados pela técnica VNTR atualmente dispõe de 45 *loci* VNTR; 43 declarados a partir de estudos de *M. bovis* (Le Flèche *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2003, Roring *et al.*, 2004) e *M. tuberculosis* (Le Flèche *et al.*, 2001, Supply *et al.*, 2006) e os dois *loci* restantes identificados por Le Flèche *et al.* (2001).

Os MIRU estão dispersos em regiões intergênicas do genoma do complexo *M. tuberculosis* e tem se mostrado úteis para genotipagem desses isolados. Os marcadores utilizados possuem de 40 a 100 bp e correspondem a marcadores importantes para estudos evolutivos e filogenéticos (Supply *et al.*, 1997). São classificados em três classes (I, II, III) com base no seu comprimento, sequência nucleotídica e organização. As sequências do tipo I contém aproximadamente 77 bp enquanto as sequências dos tipos II e III são caracterizadas por um intervalo (*gap*) de 24 e 15 bp nas extremidades 3' e 5' das sequências do tipo I, respectivamente. Sequências mistas dos tipos II/III, contendo

gaps também foram relatadas (Supply *et al.*, 1997).

Alguns MIRU podem conter um *open reading frame* (ORF), ou seja, uma porção do genoma que contém uma sequência de bases que pode codificar uma proteína. Estas ORF possuem os códons de terminação e de iniciação dos seus flaqueadores genéticos (Supply *et al.*, 1997). Estes flaqueadores estão envolvidos em diversos mecanismos metabólicos e regulatórios, incluindo a biossíntese ou degradação dos lipídeos, dos ácidos nucleicos e das proteínas, produção de energia ou transdução de sinais. Nenhuma relação óbvia pode ser encontrada entre a função desses genes e o polimorfismo dos flaqueadores dos MIRU (Supply *et al.*, 2000).

O MIRU mostrou-se igualmente aplicável para tipagem de *Mycobacterium bovis* (Cowan *et al.*, 2002) apresentando alto poder discriminatório para cepas com poucas cópias de IS6110 quando comparado com RFLP IS6110 (Lee *et al.*, 2002).

Os *loci* genéticos contendo VNTR formam a base do mapeamento genético humano e são usados na medicina forense humana e nos testes de paternidade (Nakamura *et al.*, 1987). Também são ferramentas de grande valor nos estudos de vários aspectos evolutivos, assim como os estudos de genética populacional nos eucariotos (Epplen *et al.*, 1997).

2.6.4. MST (Multispacer Sequence Typing)

O *Multispacer Sequence Typing* é um dos métodos de genotipagem utilizados atualmente em estudos de epidemiologia molecular. A discriminação de estirpes de microrganismos por essa técnica é feita pela detecção de polimorfismos em várias regiões do genoma (Drancourt *et al.*, 2004). O MST foi desenvolvido por Michael Drancourt *et al.* (2004) quando investigavam cepas de *Yersinia pestis*, bactéria altamente patogênica causadora da peste negra,

doença bacteriana infecciosa que acomete homens e animais. A idéia surgiu do resultado de um estudo realizado por Andersson *et al.* (1998) com o genoma de *Rickettsia prowazekii* onde foi detectado a presença de sequências espaçadoras intergênicas, caracterizadas por sofrer uma pressão evolutiva menor do que as sequências codificadoras de proteínas, sugerindo que pudesse haver variações ao nível de nucleotídeo nestas regiões, possibilitando diferenciar microrganismos intimamente relacionados (Andersson *et al.*, 1998).

Diante dessa informação, Drancourt *et al.* (2004) sugeriram de que o sequenciamento de várias regiões espaçadoras intergênicas poderia permitir a determinação de um biotipo específico padrão de *Y. pestis*, desenvolvendo, então, o *Multispacer Sequence Typing*. Os resultados confirmaram a hipótese e permitiram a validação desse método como uma ferramenta útil para genotipagem desse agente.

Todas as investigações realizadas com base no MST tiveram ocorrência na França e desde o ano de 2004 a técnica já foi aplicada para *Bartonella quintana*, *Rickettsia conori*, *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* e se mostrou bastante eficaz em todos os estudos realizados (Djelouadji *et al.*, 2008).

O MST é um método que demanda pequenas quantidades de DNA e se mostra vantajoso por ser uma técnica baseada em sequenciamento, o que permite reconhecer toda a diversidade genética dos marcadores utilizados e ainda permite a comparação de resultados *in silico*. Os dados gerados pelo emprego do MST podem contribuir para o fortalecimento de informações epidemiológicas, uma vez que podem auxiliar nas análises sobre a dinâmica da população de microrganismos, na detecção de contaminações cruzadas em laboratórios, na determinação de rotas de transmissão de doenças, na identificação de surtos infecciosos e no reconhecimento de

fontes de contaminação (Djelouadji *et al.*, 2008).

O uso da bioinformática constitui o primeiro passo na aplicação da técnica. É pela utilização de um banco de dados genômicos que será possível definir as regiões no genoma bacteriano que irá constituir o estudo. O *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) é uma divisão da Biblioteca Nacional de Medicina (*National Library of Medicine*) nos Estados Unidos responsável pelo desenvolvimento de novas tecnologias para auxiliar no entendimento de processos genéticos e moleculares fundamentais para o controle de doenças e da saúde. O NCBI é um sítio que alberga todas as sequências de DNA do *GenBank* desde 1992. Oferece várias ferramentas de bioinformática, que permitem ao usuário analisar *in silico* sequências de DNA, RNA e proteínas, sendo o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) uma das ferramentas mais utilizadas. O NCBI permite a comparação de resultados de pesquisas realizadas em todo o mundo, acelerando e otimizando as investigações em nível molecular (Benson *et al.*, 2008).

A análise comparativa de genomas é uma abordagem relativamente recente. Teve início com o sequenciamento dos primeiros genomas na década de 1990 e suas ferramentas mais importantes são procedentes de técnicas clássicas de análise de sequências algorítmicas com base no alinhamento global e local, métodos de análise filogenética e as implementações destes algoritmos (Thompson *et al.*, 1994).

O uso de ferramentas de bioinformática na aplicação da técnica MST é de suma importância. Em todos os estudos realizados até o momento, a técnica foi aplicada de forma diferenciada somente nas etapas que correspondem às análises *in silico* para seleção de regiões espaçadoras intergênicas e análise de resultados de modo geral. Isso ocorre devido à ampla variedade de *softwares* disponíveis, criados na tentativa de organizar e facilitar o acesso eficiente e rápido às informações geradas pelos projetos de pesquisa de pequena e grande escala.

A determinação das sequências espaçadoras intergênicas requer várias etapas. A primeira delas é localizar as sequências bacterianas no *GenBank*, programa que funciona como um portal que dá acesso a todas as informações disponíveis já descritas sobre a sequência alvo. Dados de taxonomia, filogenia, localização da sequência no genoma, sequências de aminoácidos, regiões codificadoras de proteínas no genoma, referências bibliográficas e uma série de outras informações estão à disposição de investigadores (Benson *et al.*, 2008).

Uma vez localizadas no *GenBank*, as sequências deverão ser alinhadas. O alinhamento busca alcançar níveis máximos de identidade com o objetivo de estimar o grau de similaridade e possível homologia entre duas ou mais sequências. A comparação e as análises do alinhamento são normalmente realizadas no BLASTn (*Standard Nucleotide BLAST*). A comparação das sequências alinhadas irá determinar regiões espaçadoras que podem ser utilizadas no estudo (Drancourt *et al.*, 2004).

Após o alinhamento pelo BLASTn essas sequências podem ser exportadas para softwares como GeneComp (www.genecomp.com/) e EMBOSS (<http://emboss.sourceforge.net/>), ferramentas utilizadas para visualizar e analisar a variação existente entre essas sequências, destacando no genoma regiões de repetição, inserção, deleção e rearranjos de segmentos genômicos (Li *et al.*, 2006; Djelouadji *et al.*, 2008).

Nesse momento serão visualizadas centenas de sequências intergênicas variáveis que poderiam ser usadas no estudo. Todas elas devem ser exportadas para o CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw/), um software que executa alinhamentos múltiplos e permite realizar triagens que irão selecionar somente as sequências de interesse de acordo com critérios estipulados pelo investigador. Por exemplo: i) que haja um grau de similaridade entre as sequências entre 70 e 99% (garantindo a variabilidade mínima e

máxima dos espaçadores); ii) que os espaçadores não sejam <150 bp e nem >600 bp; iii) que as diferenças entre as cepas sejam > 4bp; iv) que os espaçadores intergênicos conservados para ambos os genomas possam ser determinados pelo grau de similaridade e variabilidade, dentre outras.

Uma vez definidas as regiões intergênicas do estudo, as sequências específicas dos iniciadores para os segmentos genômicos de interesse devem ser determinadas. Muitos autores fazem uso do programa Primer3 (primer3.sourceforge.net) para desenhar os iniciadores e ressaltam que o desenho é fundamental para o sucesso da PCR. Deve-se verificar a especificidade dos iniciadores desenhados realizando um BLASTn e comparando os resultados disponíveis no GenBank. (Li *et al.*, 2006; Djelouadji *et al.*, 2008).

O próximo passo é feito no laboratório e consiste das seguintes etapas: extração de DNA das amostras que compõem o estudo, padronização de um protocolo de PCR para cada iniciador alvo do estudo e sequenciamento dos fragmentos de interesse (pode ser feito pelo método de escolha do investigador).

A etapa mais importante consiste na análise dos dados obtidos pela eletroforese capilar. Atualmente existe uma ampla variedade de *softwares* e algoritmos disponíveis, que utilizam sequências de nucleotídeos para recuperar os padrões genéticos e evolutivos das relações entre os organismos. A escolha do programa, assim como o modelo estatístico empregado no estudo, será feita com base no objetivo do investigador e nos diferentes padrões polimórficos obtidos entre as amostras durante o experimento (Posada e Crandall, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Foram analisados DNA de 58 amostras de *M. bovis* procedentes de seis estados brasileiros. O trabalho foi organizado da

seguinte forma: com a finalidade de verificar a diversidade genética das regiões espaçadoras propostas neste trabalho, inicialmente, 15 isolados de *M. bovis* foram escolhidos aleatoriamente e foram sequenciados para cada uma dessas regiões. As sequências geradas pelo sequenciamento foram comparadas com a cepa padrão AF2122/97 (Genbank: NC_002945.3) obtida *in silico*. As regiões espaçadoras que não revelaram a ocorrência de eventos genéticos como repetição em tandem, deleção, inserção ou SNP foram excluídas deste trabalho e as que revelaram variabilidade genética foram sequenciadas para o restante das amostras que compuseram o estudo.

3.2. Amostras

Para a realização do trabalho foram utilizadas 58 amostras de tecidos com lesões sugestivas de tuberculose bovina procedentes de rebanhos bovinos de seis estados brasileiros: Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Mato Grosso (Tab. 1).

O isolamento do agente *M. bovis* nas amostras foi feito pelo Setor de Diagnóstico de Doenças Bacterianas (DDB) pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG).

Aproximadamente 0,2 mL de inóculo de cada amostra foram semeadas separadamente em tubos contendo meio *Stonebrink* e incubadas em estufa a 36°C ± 1°C, por até 10 semanas, sendo a identificação dos isolados feita mediante a realização de provas bioquímicas (Mota, 1985; Kent e Kubica, 1985; Kantor, 1998; Grange *et al.*, 1996; Bovine..., 2004). As amostras que apresentaram UFC (Unidade formadora de colônia) típica de *M. bovis* tiveram suas colônias transferidas para um Eppendorf contendo aproximadamente 1,5 mL de tampão TE 1x (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) e foram inativadas a 87°C ± 1°C por 1 hora em banho-maria. Posteriormente foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da mesma instituição para realização de testes de identificação também por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O isolamento ocorreu entre os anos de 2006 e 2010 e atualmente os isolados compõem o banco de amostras dessa mesma instituição. Também foram utilizadas quatro amostras padrão de *Mycobacterium*: CR01 *M. bovis*, CR02 *M. bovis* AN5, CR13 *M. bovis* BCG e CR36 *M. bovis* México, cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (IOC – FIOCRUZ) – Rio de Janeiro, totalizando uma amostragem de 62 isolados de *M. bovis*.

Tabela 1. Amostras de *M. bovis* procedentes de rebanhos bovinos de seis estados brasileiros (Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo) isoladas entre os anos de 2006 a 2010.

Ano \ Estado	MG	GO	MT	RS	PR	SP	Total
2006	13	-	-	-	-	-	13
2007	15	-	-	-	-	-	15
2008	4	2	-	-	-	-	6
2009	14	1	1	1	-	1	18
2010	2	-	-	-	1	3	6
Total	48	3	1	1	1	4	58

3.3. Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) da rede laboratorial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). O trabalho contou com o apoio do Setor de Diagnóstico de Doenças Bacterianas (DDB) da mesma instituição e do Laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

3.4. Extração do DNA genômico

A extração do DNA de cada amostra foi realizada a partir de 200 µL de suspensão bacteriana aliquoteada em um tubo de 1,5 ml, constando de adição de 60µL de lisozima (10mg/mL, SIGMA, EUA), agitação em vortex e incubação em bloco térmico, a 37° C por 1h; logo após, foi adicionado 40 µL de Proteinase K (10 mg/mL, Invitrogen, EUA), seguido por agitação em vortex e incubação em bloco térmico, a 56° C por 18h. Foi adicionado em cada tubo 500µL de Fenol saturado pH 8.0, seguido de agitação em vortex e centrifugação a 11.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, com posterior adição de 300µL de etanol absoluto e 30µL de álcool isoamílico, homogeneizados por inversão e centrifugados a 11.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e os tubos submetidos a aquecimento em bloco térmico a 40° C por 30min para secagem do sedimento de DNA formado. O DNA foi ressuscitado em 100µL de tampão TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA,pH 8.0) e armazenados a -20°C até o momento do uso (Sambrook, 1989, modificado).

3.5. Avaliação do grau de pureza do DNA extraído

A pureza do DNA foi determinada a partir da leitura de absorbância em 260nm (concentração do DNA em mg/mL) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no Nanovue® (GE Healthcare, EUA). A relação 260/280nm foi utilizada como indicativo de grau de pureza do DNA obtido e mostrou-se adequado em todas as amostras utilizadas neste estudo (Boletim técnico T042-NanoDrop Spectrophotometers - Thermo Fisher Scientific).

3.6. Seleção dos iniciadores e padronização das reações de PCR

Neste estudo foram utilizados 14 pares de iniciadores propostos por Djelouadji *et al.* (2008) ao padronizar o MST para genotipagem de *M. tuberculosis* (Tab.2).

A padronização das reações de PCR foi feita a partir de testes com os iniciadores em diferentes concentrações (0,25 pmol, 0,5 pmol e 0,75 pmol) e em diferentes temperaturas (50°C a 67°C) utilizando o Termociclador Px2 Thermal Cyler (Milford, MA, EUA). Reações de 20 µL foram padronizadas com as seguintes concentrações de reagentes: 0,25 pmol/µL para cada iniciador, 20% de tampão Go Taq Green® 5x (Promega, EUA), 1,5 mmol MgCl₂, 200 mmol/L dNTP (Invitrogen, EUA), 1U JumpStart® Taq DNA Polymerase (Sigma, EUA). Como controles positivos foram utilizados as amostras padrão *M. bovis* CR02 e *M. tuberculosis* CR23 e como controle negativo a reação de PCR sem aplicação de DNA. As condições de amplificação das reações de PCR determinadas para os iniciadores propostos neste estudo são exibidos na tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação por PCR de DNA de *M. tuberculosis* propostos por Djelouadji *et al.* (2008) e ciclagem padronizada para amplificação por PCR das regiões espaçadoras alvo do estudo.

Espaçador	ORF	Posição da sequência no genoma da cepa H37Rv (Genbank: AL123456)	Oligonucleotídeos	Produto de PCR (bp)	Ciclagem para amplificação por PCR no termociclador				
MST1	Proteína hipotética conservada	71487	GCTGGCCGATCTGCGCGC	308	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
	Proteína hipotética conservada	71795	GATGGTCTCCCGGCTGAT		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C
MST2	Mce- Proteína da família MCEF1	206690	GCCCCGCCAGCGGTGAACTGG	338	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
	Proteína de membrana associada Mce	207028	GCGCCAAGGCCACCGGCCAA		94°C	95°C	67°C	72°C	72°C
MST3	Proteína hipotética conservada	1622918	TCGAGGATTCTGGGACTAT	275	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
	Proteína hipotética conservada	1623193	CTGTGGCAGGCTCCCGGTAG		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C
MST4	Ubiquinol-Citocromo C redutase	2461301	ATGGGTTCCGCCAGACGGCGAG	305	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
	Proteína conservada trans-membrana	2461606	GATCAGCTACGGGTTGGCCG		94°C	95°C	58°C	72°C	72°C
MST5	Proteína reguladora transcricional	3423121	CGGCCAGCCGCGCGGACGA	291	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
	Desidrogenase acil CoA FADE22	3423412	GATTGCGTTGCTGGACGGCCC		94°C	95°C	65°C	72°C	72°C
MST6	Helicase Hely ATP-dependente DNA	2351811	CTGTGAGATCGGTGTGCTTT	603	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
	Sec-Proteína translocase independente	2352414	CTGCTGATCGTGATGCTGAA		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C

Espaçador	ORF	Posição da sequência no genoma da cepa H37Rv (Genbank: AL123456)	Oligonucleotídeos	Produto de PCR (bp)	Ciclagem para amplificação por PCR no termociclador				
MST7	Proteína hipotética conservada	2401532	GCACCGGATTCAACGTATTC	507	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
	Proteína hipotética conservada	2402039	TAGTAGGGCACTAGCACCTC		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C
MST8	Proteína da família PE-PGRS	2424819	GCCGCAATCACAAACGACAT	455	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
(MT2221)	Proteína de ligação à penicilina	2425274	GCTACTTCGACGACGTGTAT		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C
MST9	Proteína integral conservada de membrana	2990382	CTTCATGACGTTGGATCGCT	525	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
	Proteína hipotética conservada	2990907	CGCAATGCGACTCGAATTTTC		94°C	95°C	54°C	72°C	72°C
MST10*	RNA polimerase fator sigma	3023146	CTTTGGGCGATTTTCATCGAG	481				*	
	Repressora/ativadora dependente de ferro	3023627	CTCTTCCTCGAGGTCGTAGAT						*
MST11	Proteína hipotética conservada	577151	AGGTGTTAGAGGTGGTGGAT	692	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
(ETR-C)	Proteína integral conservada de membrana	577843	AACCAAAGTCATATTGGGATGA		94°C	95°C	55°C	72°C	72°C
MST12	Putativo histidina quinase Senx3	580482	GTTGATCGAGGCCATACCG	637	5 min (1x)	25 seg (40x)			5 min (1x)
(ETR-D)	Proteínas de transdução sensorial Regx3	581119	GAATAGGGCTTGGTCACGTA		94°C	95°C	60°C	72°C	72°C

Espaçador	ORF	Posição da sequência no genoma da cepa H37Rv (Genbank: AL123456)	Oligonucleotídeos	Produto de PCR (bp)	Ciclagem para amplificação por PCR no termociclador				
MST13	Proteína hipotética conservada	1955383	CGAGTTCACCGTCCATCATC	554	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
(Mtub21)	Proteína de ligação à penicilina	1955937	GAGACAACGGTCATCGACTT		94°C	95°C	56°C	72°C	72°C
MST14	Proteína reguladora transcricional	3595692	CATAGTGAGGAGTAACGACTA	648	5 min (1x)	35 seg (35x)			5 min (1x)
	Componente sensor de Quinase	3596340	CTGATCATGGTGATCACCGA		94°C	95°C	50°C	72°C	72°C

* Não foi possível padronizar a reação de PCR para a região espaçadora MST10, sendo dessa forma excluída do estudo.

Sessenta e duas amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR para amplificação de cada região espaçadora alvo do estudo. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese, utilizando-se uma fonte de energia para eletroforese (Power PAC Basic/ Marca Biorad), em 40 mL gel de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), a uma voltagem de 100V por 45 min. As bandas foram visualizadas por um transiluminador com exposição à luz ultravioleta e fotografadas por um sistema de fotodocumentação (Vilber Loumart). DNA Ladder Invitrogen® de 100pb e 1Kb foram utilizados como marcadores. Os diferentes *loci* analisados permitem identificar possíveis eventos genéticos, como, deleção, inserção, substituição de nucleotídeos e repetições em *tandem*.

3.7. Sequenciamento dos fragmentos de DNA alvo do estudo

3.7.1. Reações de PCR e purificação dos produtos de PCR

O passo seguinte à padronização da PCR para cada iniciador foi ajustar o volume final da reação de 20 µL para 60 µL, dando início ao protocolo de sequenciamento. O DNA das amostras de *M. bovis* que compuseram o estudo foi novamente amplificado para os iniciadores propostos, sendo 10 µL do produto de PCR obtido de cada amostra, submetidos à eletroforese em gel de agarose visando confirmar a amplificação da banda alvo, e os 50 µL do produto restante das amostras que amplificaram no gel, submetidos ao processo de purificação pelo PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, EUA) e utilizados como molde para a reação de sequenciamento.

3.7.2. Reação de sequenciamento

O produto de PCR purificado de cada amostra foi sequenciado duas vezes empregando-se os iniciadores senso e anti-senso. A quantidade de cada insumo utilizado no preparo do *mix* das reações de sequenciamento foi calculada com base no

protocolo do Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*) com algumas modificações. Reações de 5,4 µL foram padronizadas com as seguintes concentrações de reagentes: 0,12 pmol de iniciador, 0,17% de Big Dye Sequencing Buffer 5x (*Applied Biosystems*, EUA) e 0,17% de Big Dye Terminator Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*, EUA). O produto purificado que apresentou na concentração de DNA um valor acima de 35 ng/ µL foi diluído em água deionizada e posteriormente adicionado na reação totalizando um volume final de 11,4 µL. As condições utilizadas para reação de sequenciamento foram: uma etapa de desnaturação a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 20 s e 60°C por 3 min. As amostras foram armazenadas a 4°C ao abrigo de luz até o passo de purificação dos produtos da reação.

3.7.3. Purificação dos produtos da reação de sequenciamento

A purificação do produto da reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo proposto por Figueiredo *et al.* (2003), com modificações. A purificação teve início com a adição de 40 µL de isopropanol 65% em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão por 30 seg e mantidas ao abrigo de luz por 15 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 14.000 x g por 25 min (Boeco U-32R). Descartou-se com cuidado o sobrenadante e 300 µL de etanol 60% foram adicionados. Uma nova homogeneização por inversão foi realizada e as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado com cuidado e os tubos foram aquecidos em banho seco a 70°C por 2 min para remover qualquer resíduo de etanol presente. Em seguida, 14 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, EUA) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas suavemente com a ajuda das mãos e uma centrifugação rápida (5.000g por 5s) foi realizada para concentrar todo o DNA presente no tubo.

3.7.4. Eletroforese Capilar

Catorze microlitros de cada amostra purificada foi aplicada em uma placa de 96 poços (96-Well Standard Plate Base) (Applied Biosystems) que foi posteriormente submetida à temperatura de 96°C por 3 min no termociclador para desnaturação do DNA. Em seguida foram inseridas em sequenciador automático (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers, Applied Biosystems, EUA) com parâmetros definidos conforme recomendações do fabricante.

3.8. Análise de dados

3.8.1. Edição das sequências

A edição das sequências foi realizada no programa Bioedit v.7.0.9 (Hall, 1999). As sequências que apresentaram ausência de sinal, sinal muito baixo, sinal muito alto, picos sobrepostos no eletroferograma ou que não obtiveram a cobertura completa do evento genético (quando presente) característico da região espaçadora foram novamente sequenciadas. Aquelas que mostraram picos nítidos e de boa qualidade foram analisadas. Primeiramente montou-se

a sequência consenso a partir do alinhamento da sobreposição dos fragmentos gerados pelos iniciadores senso e anti-senso. As sequências obtidas foram comparadas com a sequência padrão do *M. bovis* AF2122/97 disponível no Genbank (NC_002945.3). Posteriormente todas as sequências obtidas para cada iniciador foram alinhadas para verificar o grau de similaridade entre duas ou mais sequências e a diversidade alélica presente em cada região espaçadora. A cada alelo identificado foi designado um número identificador. Para cada isolado, o conjunto dos alelos em cada um dos *locus* definiu um perfil alélico ou uma sequência tipo (ST), que identificou de forma inequívoca um clone. Os isolados de *M. bovis* analisados neste estudo foram identificados pelos números 1-58. Dados adjacentes como o ano de isolamento, localização geográfica, perfil de espigotipo e município de origem do animal foram utilizados nas análises para inferir a relação de parentesco existente entre os isolados e encontram-se disponíveis na tabela 3. As amostras padrão CR01, CR02, CR13, CR36 não estão na tabela e foram representadas neste estudo pelos números 59-62, respectivamente. A cepa padrão AF2122/97, obtida in silico, foi incluída nas análises e foi identificada pelo número 63.

Tabela 3. Identificação dos isolados de *M. bovis* analisados no estudo, ano de isolamento, localização geográfica, perfil de espilogotipo e município de origem do animal.

Identificação do isolado	Ano	UF	Espilogotipo	Município	Identificação do isolado	Ano	UF	Espilogotipo	Município
1	2006	MG	SB1033	Itabirito	30	2008	GO	-	Rio Verde
2	2006	MG	SB1033	Itabirito	31	2008	MG	-	Guiricema
3	2006	MG	SB1033	Itabirito	32	2008	MG	-	Patrocínio
4	2006	MG	SB1093	Prata	33	2008	MG	-	Guiricema
5	2006	MG	SB1139	Sta. Vitória	34	2008	GO	-	Luziânia
6	2006	MG	SB0295	Gurinhata	35	2009	GO	-	Aporé
7	2006	MG	SB0333	Nova Módica	36	2009	RS	-	S.V. do Palmar
8	2006	MG	SB0121	Alpercata	37	2009	MG	-	Ituiutaba
9	2006	MG	SB0295	Gurinhata	38	2009	MG	-	Guiricema
10	2006	MG	SB0121	Conselh. Pena	39	2009	MG	-	Guiricema
11	2006	MG	SB0267	Muriaé	40	2009	MG	-	Guiricema
12	2006	MG	SB0121	Camp. Verde	41	2009	MG	-	Eugenópolis
13	2006	MG	-	Capitólio	42	2009	SP	-	Fernandópolis
14	2007	MG	SB1135	B. Brandão	43	2009	MG	-	Guiricema
15	2007	MG	SB0121	ignorado	44	2009	MG	-	Guiricema
16	2007	MG	SB0295	Caratinga	45	2009	MG	-	Miradouro
17	2007	MG	SB1135	B. Brandão	46	2009	MG	-	Uberaba
18	2007	MG	SB1135	B. Brandão	47	2009	MG	-	Serra do Salitre
19	2007	MG	SB1135	B. Brandão	48	2009	MG	-	Lagoa Grande
20	2007	MG	SB1135	B. Brandão	49	2009	MT	-	Jauru
21	2007	MG	SB1135	B. Brandão	50	2009	MG	-	Serra do Salitre
22	2007	MG	SB1135	B. Brandão	51	2009	MG	-	Guidoval
23	2007	MG	SB1135	B. Brandão	52	2009	MG	-	Muriaé
24	2007	MG	SB1135	B. Brandão	53	2010	MG	-	Araguari
25	2007	MG	SB1135	B. Brandão	54	2010	MG	-	Carneirinho
26	2007	MG	SB1135	B. Brandão	55	2010	PR	-	S. do Iguaçú
27	2007	MG	SB0121	U. de Minas	56	2010	SP	-	São Simão
28	2007	MG	SB1135	B. Brandão	57	2010	SP	-	S.R.P. Quatro
29	2008	MG	-	Muriaé	58	2010	SP	-	São Simão

Os perfis de espilgotipo dos isolados analisados no estudo foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (IOC – FIOCRUZ) – Rio de Janeiro.

3.8.2. Cálculo da diversidade alélica

Uma avaliação de qual o método de tipificação é mais eficiente tem que ser baseada em um número de fatores: capacidade de tipificação, reprodutibilidade e discriminação. Destas características, a capacidade de tipificação e a reprodutibilidade são relativamente fáceis de quantificar e são frequentemente expressas como percentagens simples. Assim, a capacidade de tipificação de um método é a porcentagem de distinguir as amostras bacterianas que podem ser identificadas como positivas e a reprodutibilidade é a porcentagem de amostras que tem o mesmo resultado em

repetidos testes. O poder discriminatório de um método de tipificação é a sua habilidade de distinção entre amostras não correlacionadas.

Hunter e Gaston (1988) sugeriram o uso de um índice numérico de discriminação (D), baseado na probabilidade de que duas amostras, não correlacionadas de uma população teste, serem identificadas como pertencentes a diferentes grupos. Esta probabilidade é calculada pelo índice Hunter-Gaston de discriminação, que foi desenvolvido para a descrição de diversidades de espécies em um determinado habitat ecológico. A determinação é calculada com base no número de tipos definidos durante o ensaio e as frequências relativas de cada tipo.

Este índice pode ser derivado da teoria de probabilidade elementar e é dado pela seguinte equação: $SID = 1 - D$

$$D = \frac{n_1(n_1-1) + n_2(n_2-1) + n_3(n_3-1) + \dots + n_j(n_j-1)}{N(N-1)}$$

Onde D é a medida de diversidade, N é o número total de isolados na população da amostra, s é o número total de tipos descritos, e n_j é o número de cepas pertencentes ao tipo j. Segundo Hunter e Gaston, um teste para estudos epidemiológicos é considerado eficiente quando possuir um índice de discriminação de pelo menos 90% (Hunter e Gaston, 1988).

3.8.3. Análises da relação de parentesco entre os isolados

As análises de descendência evolutiva dos isolados de *M. bovis* que constituem o estudo foram realizadas com base na aplicação do algoritmo conhecido como eBURST (Feil *et al.*, 2004). O algoritmo eBURST é um programa gratuito e encontra-se disponível para download em <http://www.phylovis.net>. O programa foi criado para analisar possíveis padrões de descendência evolutiva a partir de dados de diferentes perfis genotípicos, organizados em formas de complexos clonais, permitindo

dessa forma, verificar a relação de parentesco entre os isolados. O parentesco dos isolados é exibido como um dendrograma que expõe os grupos formados pelos membros mais estreitamente relacionados, sem inferir dados sobre sua ancestralidade. O programa apresenta a vantagem da possibilidade de análises de sequências *multilocus* e a realização de testes de recombinação, oferecendo resultados mais específicos evitando dessa forma distorções na sua interpretação (Turner *et al.*, 2007).

Os dados são analisados com base nas ST determinadas a partir dos diferentes perfis alélicos encontrados durante a realização do ensaio. Os complexos clonais (CC) são determinados por um modelo simples de expansão e diversificação clonal com base nas diferenças encontradas entre os perfis alélicos. A cada CC é atribuído um genótipo fundador que exibe um padrão hipotético mais provável de descendência evolutiva entre as ST que constituem o complexo. As ST são organizadas dentro de um complexo

clonal pela comparação da variação existente entre os *loci* do genótipo fundador com os outros isolados. A variação encontrada em apenas um *locus* é chamada de SLV (*single locus variants*), por dois *loci* é chamada DLV (*double locus variants*) e por três, TLV (*triple locus variants*) (Francisco *et al.*, 2009). A confiança para a atribuição de cada SLV, DLV e TLV ao ST fundador de seu complexo clonal é avaliada por *bootstrapping* (Feil *et al.*, 2004).

Vários complexos clonais podem ser formados a partir dos dados fornecidos ao programa e aquele que for representado pelo maior número de SLV será classificado como o complexo clonal fundador. No caso de empate, o isolado que apresentar o maior número de DLV será designado fundador do complexo clonal.

É importante ressaltar que, ainda que os complexos clonais estejam estreitamente relacionados, a reconstrução das vias entre os mesmos não é recomendada; o eBURST é projetado para mostrar apenas os padrões mais prováveis de descendência dentro de cada complexo clonal.

3.8.4. Análise da frequência alélica das sequências tipo identificadas no estudo

A frequência alélica das sequências tipo determinadas neste estudo foi calculada utilizando-se o programa START2 (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests Version 2) (Jolley *et al.*, 2001). START2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>) foi projetado principalmente para estudos de epidemiologia global ou em longo prazo. O programa foi desenvolvido com o objetivo de analisar dados que possam auxiliar na investigação da estrutura da população bacteriana usando dados de sequências *multilocus*.

3.8.5. Análise Filogenética

A reconstrução da filogenia dos isolados de *M. bovis* analisados nesse estudo foi realizada pelo programa PubMLST (University of Oxford, Reino Unido) utilizando-se o modelo Neighbor-Joining. O programa utiliza a suíte PHILIP de

programas para criar árvores Neighbor-Joining e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com base nos perfis alélicos determinados no estudo. O programa encontra-se disponível em: <http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse/mlstanalyse.pl?site=pubmlst&page=treedraw&referer=pubmlst.org>.

3.8.6. Análise da região de diferença RD Euro1

Além da técnica MST, também foi feita a análise da RD Euro1 para o DNA das amostras relativas aos anos de 2006 e 2007 que constituíram o estudo. O objetivo foi verificar a relação desses isolados com o complexo clonal Eu1 de importância global. Marcados pela ausência da região espaçadora 11 pela técnica do *Spoligotyping*, são caracterizados como membros do complexo clonal Eu1 os isolados que apresentarem a região RD Eu1 deletada. Os iniciadores utilizados foram os mesmos preconizados por Smith *et al.* (2011) e são exibidos na tabela 4. Os fragmentos gerados correspondem a 1206 bp (região intacta) e 400 bp (região deletada). Reações de 20 μ L foram padronizadas com as seguintes concentrações de reagentes: 0.5 pmol/ μ L para cada iniciador, 20% de tampão Go Taq Green[®] 5x (Promega, EUA), 1.5 mmol MgCl₂, 200 mmol/L dNTP (Invitrogen, EUA), 1U JumpStart[®] Taq DNA Polymerase (Sigma, EUA). A condição utilizada para a reação de PCR foi: uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 50 s, 62°C por 50 s e 72°C por 80 s e uma etapa de extensão final a 72°C por 8 min. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese, utilizando-se uma fonte de energia para eletroforese (Power PAC Basic/ Marca Biorad), em 40 mL gel de agarose a 1% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), a uma voltagem de 100 V por 60 minutos. As bandas foram visualizadas por um transiluminador com exposição à luz ultravioleta e fotografadas por um sistema de fotodocumentação (Vilber Lourmat). DNA Ladder Invitrogen[®] de 100pb e 1Kb foram utilizados como marcadores.

Tabela 4. Identificação, sequência nucleotídica e posição da sequência alvo no genoma de H37Rv dos iniciadores utilizados para a reação de PCR para detecção da RD Euro1.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Posição no genoma H37Rv
RDEu1_FW (IDT, EUA)	CCGATGAACTTGGCCACAG	1767904 a 1767923
RDEu1_Rv (IDT, EUA)	CGTGGTGGTGGGATGTCTTG	1769110 a 1769091

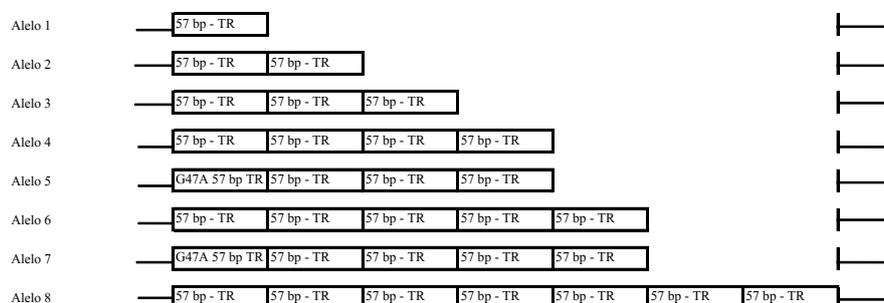
4. RESULTADOS

Sete das 14 regiões espaçadoras (MST4, MST5, MST7, MST9, MST11, MST12 e MST13) foram analisadas para 58 isolados de *M. bovis* procedentes de seis estados brasileiros (MG, SP, GO, MT, RS e PR) isolados entre os anos de 2006 a 2010, e para quatro amostras padrão de *M. bovis*: CR01 AN5, CR02, *M. bovis* BCG CR13 e *M. bovis* México CR36. Os isolados de *M. bovis* foram sequenciados para cada uma das regiões espaçadoras intergênicas disponibilizando dados que foram analisados e comparados com a cepa *M. bovis* AF2122/97 disponível no Genbank

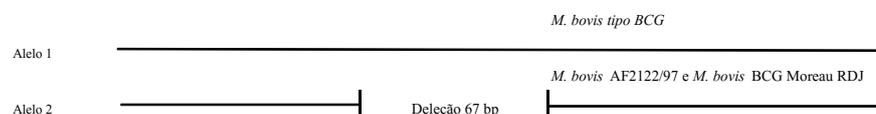
(NC_002945.3), permitindo dessa forma, a tipificação dos isolados a partir da identificação de polimorfismos genéticos. A cepa *M. bovis* AF2122/97 foi utilizada como padrão para as análises *in silico* e também foi incluída no estudo.

Os resultados revelaram a presença de quatro tipos de eventos genéticos: mutação de nucleotídeo único (SNP), inserção, deleção e repetição em tandem (TR), totalizando a partir da combinação dos genótipos obtidos um total de 28 eventos. A figura 1 mostra a representação dos eventos genéticos que caracterizaram os diferentes alelos em cada região espaçadora utilizada neste estudo.

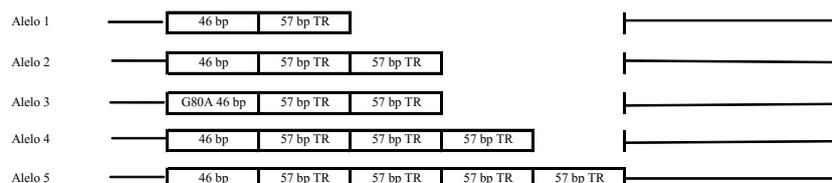
MST4



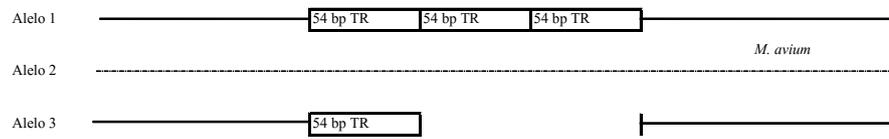
MST5



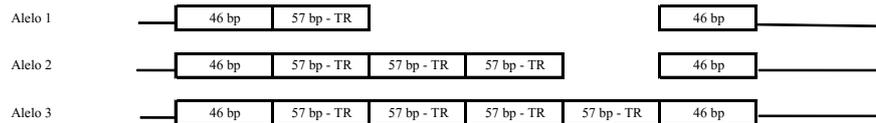
MST 7



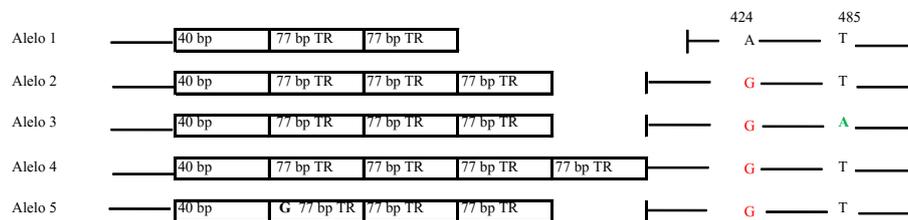
MST9



MST11



MST12



MST13

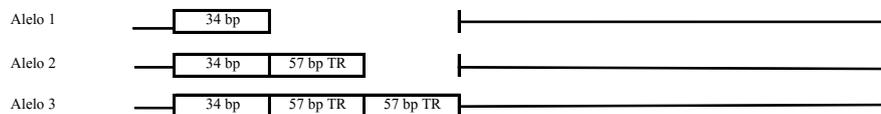


Figura 1. A figura mostra a representação dos alelos identificados para cada região espaçadora alvo do estudo. MST4 (ETR-B): oito alelos contendo de 1-7 cópias de 57 bp de sequências repetidas em tandem (TR) e a presença de um SNP G47A; MST5: deleção de 67 bp; MST7: quatro alelos contendo de 1-4 cópias de 57 bp de repetição em tandem, uma deleção de 11 bp na primeira repetição para todas as amostras e um SNP D80A; MST9: três alelos contendo 1 e 3 cópias de repetição em tandem de 54 bp e uma sequência com 3 repetições em tandem representada por alguns polimorfismos no genoma de *M. bovis*, caracterizado por um alelo diferente, de uma região repetitiva também presente no genoma de *M. avium*; MST11: três alelos contendo 3, 5 e 6 cópias repetidas em tandem de 57 pb, sendo a primeira e a última repetição caracterizada pela deleção de 11 bp em todos os isolados.; MST12: cinco alelos contendo de 1-4 cópias de repetição em tandem de 77 bp, com a primeira repetição caracterizada por uma deleção de 37 bp em todos os isolados. Também foi revelado a inserção de uma base G76, um SNP A424G, um SNP T485A e uma deleção de 18 bp após a última repetição; MST13: três alelos contendo de 1-3 cópias de 57 bp e uma deleção de 23 bp na primeira repetição em todos os isolados.

A análise da região espaçadora MST14 identificou três SNP (Fig. 2). O primeiro deles na posição A101T, o segundo na posição A305G e o terceiro na C751A, no entanto os iniciadores não forneceram a

cobertura completa da sequência para todas as amostras, limitando a variabilidade do espaçador MST14, que desse modo foi excluído do estudo.

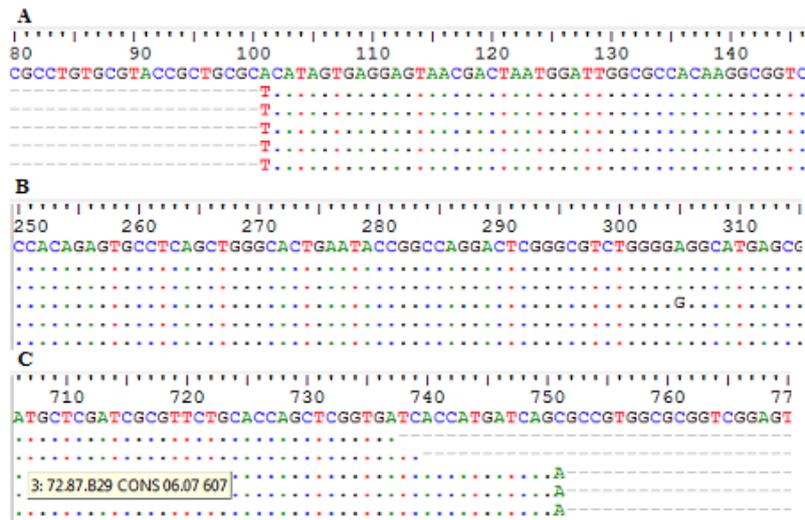


Figura 2. Representação dos SNPs identificados na região espaçadora MST14. O alinhamento A corresponde ao SNP A101T, o alinhamento B corresponde ao SNP A305G e o C ao C751A

As regiões espaçadoras MST1, MST2, MST3, MST6 e MST8 foram inicialmente sequenciadas para um número limitado de 15 amostras escolhidas aleatoriamente. Foi observado que não houve ocorrência de eventos genéticos nestas regiões, o que acarretou a exclusão desses espaçadores do estudo.

4.1. Definição dos perfis genotípicos

O alinhamento das sequências para cada *locus* permitiu identificar diferentes alelos e para cada alelo foi designado um número

identificador. O conjunto dos alelos em cada um dos *locus*, para cada isolado, definiu um perfil alélico que foi representado por uma sequência tipo (ST). A cepa *M. bovis* AF2122/97 utilizada como padrão para as análises *in silico* também obteve um perfil genotípico frente aos isolados de *M. bovis* que constituíram o estudo, totalizando neste trabalho, uma amostragem de 63 perfis alélicos. Isolados que apresentaram um mesmo perfil foram identificados por uma mesma ST reduzindo, dessa forma, para 28 o número de perfis alélicos e apontando 28 ST caracterizadas como únicas. Os dados são exibidos na tabela 5.

Tabela 5. Identificação de 28 ST únicas geradas pela comparação de 63 perfis genotípicos de isolados de *M. bovis*. ST identifica a sequência tipo que caracteriza um perfil genotípico (ou alélico) e representa os isolados que definiram perfis genotípicos idênticos; Perfil alélico representa o número identificador designado a cada alelo para cada espaçador que juntos, identificam uma ST; A Frequência revela o número de isolados que apresentaram perfis idênticos e a porcentagem (%) indica os valores em porcentagem sobre o total de 63 amostras que constituíram o estudo.

ST	Isolados que apresentaram Sequências Tipo idênticas	Perfil genotípico ou alélico							Frequência	%
		MST4	MST5	MST7	MST9	MST11	MST12	MST13		
6	6,7,8,15,16,28,37,42,49,51,53,57	4	2	4	1	2	2	3	12	19.05
17	17,18,21,22,40,43,48,50,56	4	2	4	1	1	2	3	9	14.29
1	1,2,3,32,46	3	2	4	1	2	2	3	5	7.94
10	10,33,35,38,44	4	2	4	1	1	2	2	5	7.94
19	19,23,24,26	4	2	4	1	1	5	3	4	6.35
11	11,36,41,47	6	2	4	1	2	2	3	4	6.35
14	14,20	4	2	4	1	1	3	3	2	3.17
25	25,27	4	2	4	1	2	5	3	2	3.17
45	45	1	2	4	1	1	2	3	1	1.59
30	30	2	2	4	1	1	2	2	1	1.59
61	61	3	2	1	1	2	2	1	1	1.59
54	54	3	2	4	1	1	2	3	1	1.59
31	31	4	1	4	1	2	2	1	1	1.59
5	5	4	2	2	2	2	2	3	1	1.59
39	39	4	2	4	1	1	2	1	1	1.59
9	9	4	2	4	1	3	4	3	1	1.59
4	4	4	2	4	2	1	2	3	1	1.59
13	13	5	1	4	1	1	2	2	1	1.59
12	12	5	2	4	1	2	2	3	1	1.59
52	52	6	1	4	1	2	2	3	1	1.59
63	63	6	1	4	1	2	4	3	1	1.59
29	29	6	2	4	1	1	2	2	1	1.59
62	62	6	2	4	1	2	1	2	1	1.59
59	59	6	2	4	1	2	2	2	1	1.59
60	60	6	2	4	1	2	4	2	1	1.59
58	58	7	2	3	3	2	2	3	1	1.59
55	55	7	2	4	1	2	2	3	1	1.59
34	34	8	2	4	1	2	2	1	1	1.59

A frequência com que cada alelo aparece em cada *locus* é exibida na tabela 6.

Tabela 6. Representação da frequência alélica determinada pelo programa START2 a partir dos isolados de *M. bovis* para cada *locus* analisado neste estudo.

Alelos	MST4	MST5	MST7	MST9	MST11	MST12	MST13
1	1	4	1	60	27	1	4
2	1	59	1	2	35	51	11
3	7	-	1	1	1	2	48
4	39	-	60	-	-	3	-
5	2	-	-	-	-	6	-
6	10	-	-	-	-	-	-
7	2	-	-	-	-	-	-
8	1	-	-	-	-	-	-
Alelos únicos	8	2	4	3	3	5	3

4.2. Análises de descendência evolutiva dos isolados de *M. bovis*

As análises de descendência evolutiva dos isolados de *M. bovis* que constituíram o estudo foram realizadas a partir do algoritmo eBURST. A relação de parentesco entre os isolados foi inferida pelas diferenças encontradas a partir da comparação dos perfis genotípicos determinados nos estudos, organizados em complexos clonais e representados por um dendrograma. Dessa forma, 28 ST únicas foram identificadas a partir dos 63 perfis genotípicos obtidos pelo MST após a aplicação do algoritmo eBURST. A partir desses dados foram realizadas as seguintes análises:

4.2.1. Relação entre isolados de *M. bovis* procedentes de Minas Gerais

A figura 3 mostra a distribuição de 49 amostras de *M. bovis* procedentes de 25

municípios de Minas Gerais, isolados entre os anos de 2006 a 2010, quatro amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02, *M. bovis* BCG CR13, *M. bovis* México CR36) e a cepa AF2122/97 obtida *in silico*. As análises contaram com sete regiões espaçadoras (MST4, MST5, MST7, MST9, MST11, MST12 e MST13) totalizando 54 perfis genotípicos, sendo 24 destes caracterizados como perfis únicos. As ST foram organizadas dentro de um complexo clonal (CC) pela comparação da variação existente entre os *loci* do genótipo fundador. A variação encontrada em apenas um *locus* foi chamada de SLV (*single locus variants*), por dois *loci* foi chamada DLV (*double locus variants*) e por três, TLV (*triple locus variants*) (Francisco *et al.*, 2009). A confiança para a atribuição de cada SLV, DLV e TLV ao ST fundador de seu complexo clonal foi avaliada por *bootstrapping* (Feil *et al.*, 2004). Os dados analisados revelaram a presença de quatro complexos clonais identificados por ST6, ST11, ST17 e ST59 (Fig. 3).

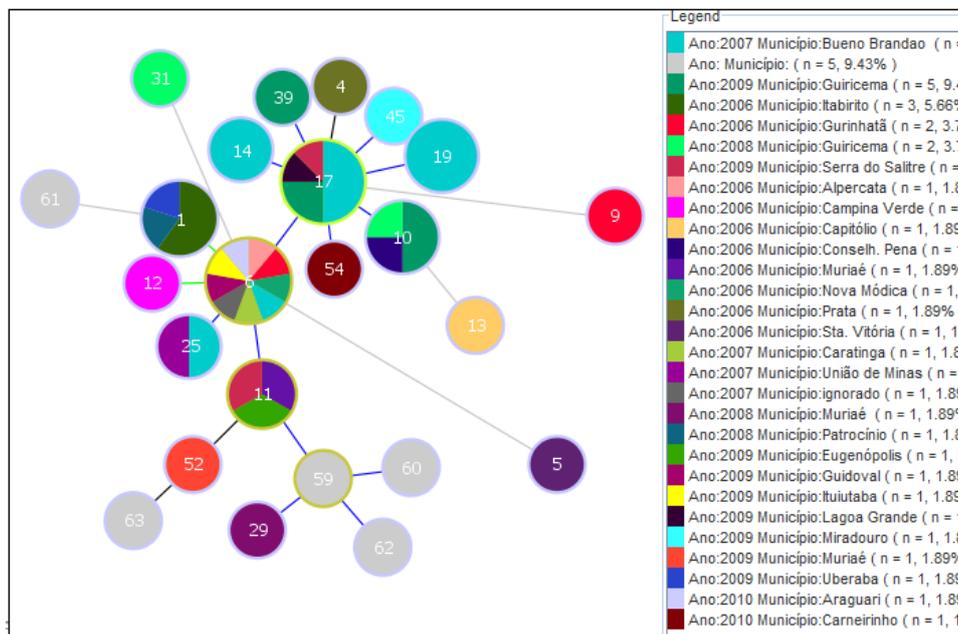


Figura 3. Dendrograma da distribuição de 49 amostras de *M. bovis* procedentes de 25 municípios de Minas Gerais, isolados entre os anos de 2006 a 2010, quatro amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02, CR13 e CR36) e a cepa *M. bovis* AF2122/97. O dendrograma revela a identificação de quatro complexos clonais (ST6, ST11, ST17 e ST59) formados a partir da comparação de 24 seqüências tipo. Na legenda inserida na figura as cores representam o município de origem do animal, n indica o número de isolados com um mesmo perfil genotípico e também está associado ao tamanho do círculo (quanto maior o círculo, maior a população representada por ele). Círculos com mais de uma cor indicam isolados com um mesmo perfil genotípico, mas procedentes de municípios diferentes.

A ST17, envolvida por uma linha verde clara, foi apontada como a ST fundadora do complexo clonal principal de todo o grupo analisado, indicando o genótipo que aparece com maior frequência entre os isolados e caracterizando o CC principal representado pelo maior número de SLV entre os quatro complexos formados. A ST 17 revelou oito SLV (ST4, ST6, ST10, ST14, ST19, ST39 e ST45) e seis DLV (ST1, ST9, ST11, ST12, ST 25 e ST 29). Os membros caracterizados pelo perfil genotípico ST17 são provenientes de quatro diferentes municípios e produziram clones estreitamente relacionados com isolados também de outros municípios. Dos 24 perfis genotípicos utilizados nesta análise, a ST17 não se mostrou estreitamente relacionada com nove das 24 ST (ST5, ST13, ST31, ST52, ST59, ST60, ST61, ST62 e ST63). Estas cinco últimas (ST59-ST63) constituem

o CC formado pelas amostras padrão de *M. bovis* juntamente com a cepa AF2122/97.

A ST6 é uma SLV da ST17, que se diversificou formando clones estreitamente relacionados constituindo cinco SLVs e 12 DLVs. Essa seqüência tipo caracterizou um genótipo que foi encontrado em nove diferentes municípios, distribuídos entre Sul de Minas, Zona da Mata, Triângulo Mineiro e Vale do Rio Doce.

4.2.2. Relação entre isolados de *M. bovis* procedentes de seis estados do Brasil

A mesma análise foi realizada, porém, inserindo dez outras seqüências tipo (ST30, ST34-36, ST42, ST49, ST55-58) procedentes de outros estados do Brasil (Goiás, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso) totalizando 28 ST. Foi

observada a formação de um quinto CC representado pela ST10 (identificada anteriormente como SLV da ST17) constituída de isolados de MG e GO. A ST10 apresentou genótipos idênticos de

isolados de dois diferentes estados e se diversificou produzindo suas próprias SLV, caracterizadas por membros com perfis genotípicos únicos (Fig. 4).

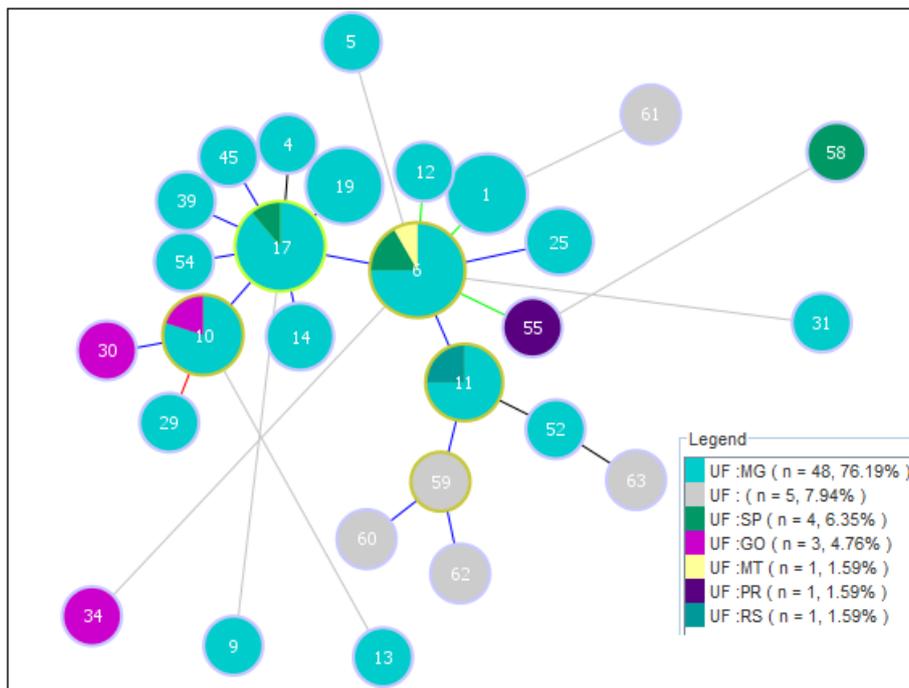


Figura 4. Dendrograma da distribuição de 59 isolados de *M. bovis* procedentes de diferentes estados do Brasil, quatro amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02, CR13 e CR36) e a cepa *M. bovis* AF2122/97, totalizando 63 amostras. As cores nos círculos indicam o Estado de origem do animal: azul (Minas Gerais), verde (São Paulo), Amarelo (Mato Grosso), violeta (Goiás), roxo (Paraná), azul escuro (Rio Grande do Sul) e cinza (representa as amostras padrão de *M. bovis* cedidas pela Fiocruz juntamente com a cepa AF2122/97).

A ST6 foi formada a partir de isolados de *M. bovis* de Minas Gerais e São Paulo (assim como o seu genótipo fundador ST17), no entanto, um membro de Mato Grosso se fez presente e duas das seis SLV formadas por este grupo foram compostas de isolados do Paraná e Rio Grande do Sul. As SLV deste CC foram indicadas por uma ligação direta com o genótipo fundador do complexo e as DLV pela ligação a um SLV que por sua vez está ligado ao fundador (com exceção das ST5 e ST31 que não apresentaram uma SLV intermediária com o genótipo fundador). Devido ao elevado número de isolados em Minas Gerais (76%) sugere-se que uma maior amostragem de isolados de

M. bovis provenientes de outros estados poderia inferir melhor a relação entre as cepas.

4.2.3. Análises dos isolados de *M. bovis* de 2006 e 2007 juntamente com o *Spoligotyping*

Os isolados referentes aos anos de 2006 e 2007 utilizados neste estudo foram submetidos à técnica *Spoligotyping*. Os dados foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

As análises contaram com 28 isolados de *M. bovis* provenientes de 14 municípios, que identificaram 13 ST pela técnica MST e oito padrões pelo *Spoligotyping*. Os dados foram aplicados no eBURST e os resultados revelaram a formação de dois complexos clonais ST6 e ST17 em que ambos apresentaram cinco SLV (Fig. 5). Nesse caso o critério de desempate ocorreu em função do maior número de DLV apresentado pela ST fundadora do complexo, apontando o ST6 como o genótipo fundador do CC principal. A ST6 se mostrou estreitamente relacionada com praticamente todo o grupo. A exceção foi a ST13, que apresentou uma variação de dois *loci* (DLV) com a ST10 e não indicou relação de parentesco com nenhum outro isolado de

M. bovis analisado. Foi observado que para o perfil genotípico que caracterizou a ST6 foram encontrados quatro diferentes padrões de espiligotipo (SB1135, SB0121, SB0295 e SB0333). No entanto, ao analisar os dois complexos clonais juntos, foi observado que o mesmo padrão de espiligotipo (SB0121) foi relacionado a quatro diferentes ST (ST6, ST10, ST12 e ST25). O mesmo ocorreu com o SB1135, que foi relacionado à ST6, ST14, ST17, ST19 e ST25. Algumas sequências tipo foram exclusivas de um único isolado e coincidentemente também revelaram padrões de espiligotipo exclusivos (ST11 com SB0267, ST4 com SB1093 e ST5 com SB1139).

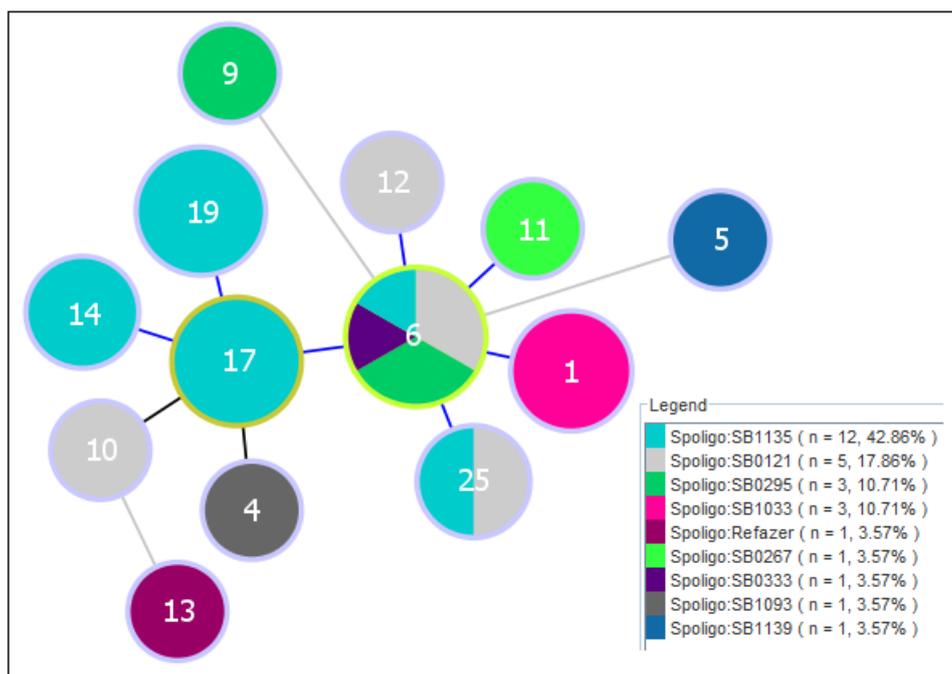


Figura 5. Dendrograma da distribuição de 13 sequências tipo e oito padrões de espiligotipo determinados pelo MST e *Spoligotyping*, respectivamente. Os dados foram obtidos a partir de 28 isolados de *M. bovis* provenientes de 14 municípios de MG e isolados entre os anos 2006 e 2007. As cores representam os diferentes padrões de espiligotipo e n indica o número de isolados com um mesmo perfil genotípico.

4.3. Análises Filogenéticas

A análise filogenética foi realizada com base no programa PubMLST utilizando o modelo Neighbor Joining. A árvore foi gerada a partir das 28 sequências tipos identificadas neste estudo (Tab. 5) constituindo um cladograma onde cada ST foi representada pelo seu respectivo número (Fig. 6).

Os resultados mostraram que as amostras foram posicionadas em grupos semelhantes aos grupos formados pelo eBURST. Foi observado que as ST1, ST6, ST11, ST12 e ST55 ficaram proximamente localizadas no centro da árvore. Quando se compara esse resultado com os perfis genotípicos de cada ST, verifica-se que a variação genética existente foi limitada pela diferença em um único *locus*, admitindo a estreita relação entre esses isolados, o que coincide com dados observados anteriormente pelo eBURST. Foi verificada a formação de cinco clados distribuídos nas extremidades da árvore e foi observado que a relação entre os clados foi gerada pela variação de três ou mais *loci* MST analisados.

O clado A (Fig. 6) foi representado por sequências tipo proveniente dos estados de MG, SP e PR. O clado B foi formado de

isolados apenas de MG de modo que as sequências tipo ST9 e ST25, caracterizadas pela formação de perfis genotípicos únicos apresentaram uma relação de parentesco mais distante em relação aos membros deste grupo. O clado C foi representado por membros de MG e GO e os isolados que se mostraram mais distantes foram aqueles que apresentaram perfis únicos. Comparando esses dados com as análises do eBURST foi observado que complexo clonal representado pela ST17 se mostrou menos relacionado com os outros isolados deste grupo em relação ao eBURST. O clado D foi representado por um isolado de GO e pela amostra padrão *M. bovis* BCG CR13 e se mostraram distantes em relação aos isolados de outros clados. O clado E foi formado basicamente pelas amostras padrão de *M. bovis* (CR01, CR02 e CR36) e pela *M. bovis* AF2122/97. Duas sequências tipo, representadas por MG estiveram presentes neste grupo. Uma delas é a ST11, que segundo os dados analisados pelo eBURST foi a cepa mais estreitamente relacionada com o complexo clonal representado pelas amostras padrão de *M. bovis* utilizadas neste estudo. Esses dados confirmam que os isolados de *M. bovis* vêm sofrendo mudanças evolutivas em diferentes regiões ao longo dos anos.

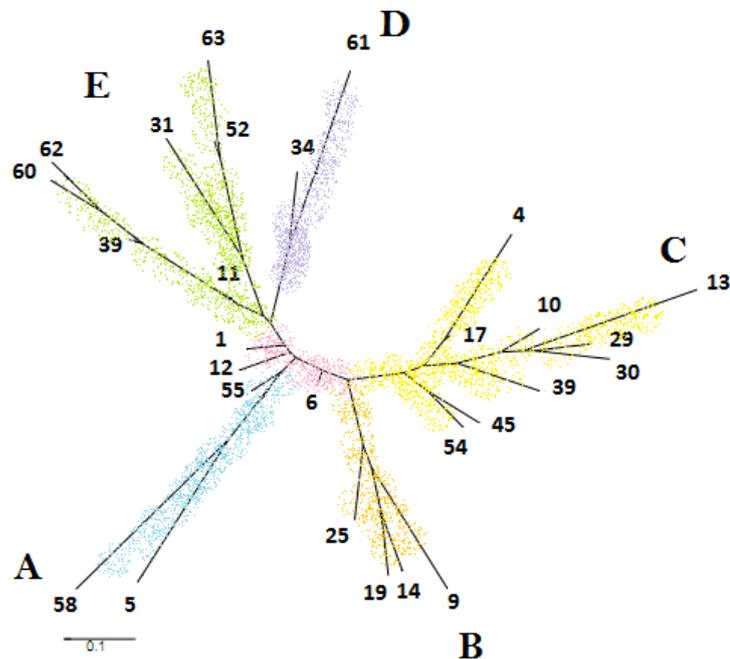


Figura 6. Árvore filogenética gerada pelo programa PubMLST. O modelo utilizado foi o Neighbor-Joining e a construção foi feita com base nas 28 sequências tipo identificadas neste estudo. Foi observada a formação de cinco clados identificados por letras e cores da seguinte forma: clado A (azul), clado B (laranja), clado C (amarelo), clado D (liláz) e clado E (verde).

4.4. Índice Hunter-Gaston (HGI)

A diversidade alélica é um bom indicador da taxa de heterogeneidade e pode ser representada pelo poder discriminatório do método testado. O poder discriminatório para uma técnica de tipificação é a sua capacidade para distinção entre cepas não relacionadas. O poder discriminatório da técnica *Multispacer Sequence Typing* foi calculado segundo o índice Hunter-Gaston de discriminação, desenvolvido para a descrição de diversidades de espécies em um determinado habitat ecológico (Hunter e Gaston, 1988). A determinação foi calculada com base no número de perfis genotípicos definidos durante o ensaio e as frequências relativas de cada perfil. O cálculo realizado para os 63 isolados de *M. bovis* e as 28 ST definidas para esse grupo revelou um índice de 93%. Reduzindo para 28 o número de isolados (2006 e 2007) e suas 24 ST, o índice caiu para 91,53%. Utilizando o mesmo cálculo para determinar a diversidade do *spoligotyping* para o grupo de 28 isolados de *M. bovis*, foi obtido um índice equivalente a 78,30%.

4.5. Análise da região de diferença RDEu1

Além do MST foi realizado a PCR para detecção da região de diferença RDEu1 para os isolados referentes aos anos de 2006 e 2007, visando determinar a sua relação com o complexo clonal Eu1 de importância global. Os isolados que apresentam a região RDEu1 deletada foram marcados pela ausência da região espaçadora 11 pela técnica do *Spoligotyping*.

Das 28 amostras correspondentes aos anos de 2006 e 2007 apenas uma (05/06) não foi submetida à PCR para região de diferença RDEu1 devido a indisponibilidade de DNA para realizar o ensaio (Tab. 7). Os resultados mostraram que das 27 amostras analisadas, 23 apresentaram a RDEu1 intacta, constituindo um amplicom de 1206 bp e quatro amostras revelaram a deleção dessa região constituindo um amplicom de 400 bp. Os resultados da PCR são exibidos na tabela 7 e a representação dos amplicons formados em gel de agarose são mostrados na figura 7.

Tabela 7. Identificação dos isolados de *M. bovis* relativos aos anos de 2006 e 2007 utilizados neste estudo, acompanhados pelos seus respectivos perfis de ST, resultado da RDEu1 e padrão de espoligotipo.

Isolado	Perfil de ST	RDEu1	Espoligotipo
1/06	ST1	deletado	SB1033
2/06	ST1	deletado	SB1033
3/06	ST1	deletado	SB1033
4/06	ST4	intacto	SB1093
5/06	ST5	-	SB1139
7/06	ST6	intacto	SB0295
8/06	ST6	intacto	SB0333
9/06	ST6	intacto	SB0121
10/06	ST9	intacto	SB0295
11/06	ST10	intacto	SB0121
12/06	ST11	deletado	SB0267
13/06	ST12	intacto	SB0121
14/06	ST13	intacto	-
1/07	ST14	intacto	SB1135
2/07	ST6	intacto	SB0121
3/07	ST6	intacto	SB0295
4/07	ST17	intacto	SB1135
5/07	ST17	intacto	SB1135
6/07	ST19	intacto	SB1135
7/07	ST14	intacto	SB1135
8/07	ST17	intacto	SB1135
9/07	ST17	intacto	SB1135
10/07	ST19	intacto	SB1135
11/07	ST19	intacto	SB1135
12/07	ST25	intacto	SB1135
13/07	ST19	intacto	SB1135
14/07	ST25	intacto	SB0121
15/07	ST6	intacto	SB1135

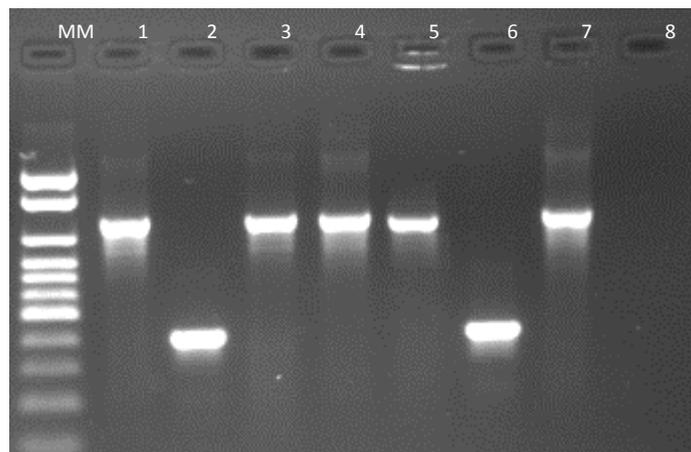


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para análise da região de diferença RDEu1. MM - marcador de peso molecular de DNA 100 bp (New England Biolabs – NEB), 1- amostra 11/06, 2- 12/06, 3- 13/06, 4- 14/06, 5- 01-07, 6- controle positivo *M. bovis* CR02, 7- *M. tuberculosis* CR23 8- controle negativo.

As amostras que apresentaram a deleção RDEu1 corresponderam as sequências tipo ST1 (três isolados) e ST11 (um isolado) pelo MST e os padrões de espoligotipo caracterizados para essas amostras foram SB1033 e SB0267, respectivamente. O SB1033 apresentou a ausência dos espaçadores 3, 6, 8-12, 16, 34 e 39-43, enquanto o SB0267 revelou a ausência dos espaçadores 3, 5, 9, 11, 16,19 e 39-43. Desse modo os isolados de *M. bovis* que constituíram a ST1 e ST11 provenientes dos anos de 2006 e 2007 foram identificados como membros do complexo clonal Eu1 de importância global.

5. DISCUSSÃO

A genotipagem é uma técnica diferencial que permite levantar dados epidemiológicos e biogeográficos acerca do patógeno *M. bovis*, disponibilizando dessa forma, informações importantes que poderão auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de combate à tuberculose bovina. As técnicas IS6110-RFLP, VNTR e *Spoligotyping* têm sido utilizadas como referência para estudar a diversidade de espécies do complexo *M. tuberculosis* (Viana-Niero *et al.*, 2001). No entanto, esses métodos não são capazes de reconhecer toda a diversidade genética das cepas analisadas como é o caso dos métodos

baseados em sequenciamento, que permitem a análise de sequências alvos moleculares, identificando dessa forma todos os eventos genéticos presentes no marcador.

O *Spoligotyping* e o VNTR são os métodos mais utilizados atualmente para tipagem de *M. bovis*. Ambos os métodos são representados por sequências simples que podem ser facilmente armazenadas em banco de dados e posteriormente comparadas por profissionais em todo o mundo. No entanto, o *spoligotyping* limita-se ao uso de apenas um *locus*, enquanto o VNTR pode levar um padrão particular a evoluir de forma convergente em diferentes linhagens. Esse fenômeno conhecido como homoplasia tem o potencial de minar as análises genotípicas acerca do marcador utilizado, acarretando em um processo evolutivo divergente (Reyes *et al.*, 2011). Comas *et al.* (2009) descobriram que filogenias construídas usando espoligotipos e *loci* VNTR apresentavam inconsistências em relação as árvores construídas a partir da análise de sequências de DNA de vários *loci*. Para inferir relações filogenéticas profundas usando VNTR, pelo menos 24 *loci* devem ser utilizados para minimizar o erro de homoplasia (Comas *et al.*, 2009).

O método MST proposto neste estudo para genotipagem de isolados de *M. bovis* oferece a vantagem do sequenciamento, o que possibilita a discriminação de isolados a partir de diferentes eventos genéticos observados em uma única sequência e permite diferenciar geneticamente isolados relacionados com base no sequenciamento de sete ou mais regiões espaçadoras, utilizando regiões menos estáveis do genoma, que associadas, permitem observar padrões de descendência evolutiva a partir da análise de agrupamentos de isolados que conciliam características genéticas comuns. Os métodos de tipagem realizados com base no sequenciamento fornecem dados importantes sobre forças evolutivas que moldam as populações bacterianas (Comas *et al.*, 2009).

A genotipagem de *Mycobacterium bovis* pela técnica *Multispacer Sequence Typing* contou com a análise de sete regiões espaçadoras intergênicas e 58 amostras representativas de *M. bovis*, incluindo quatro amostras padrão e a cepa AF2122/97 obtida *in silico*. Dessas sete regiões espaçadoras, quatro foram previamente descritas como *Exact Tandem Repeat* (ETR), definindo ETR-B (MST4), ETR-C (MST11), ETR-D também chamado MIRU4 (MST12) e Mtub21 (MST13). Os outros três espaçadores utilizados foram MST5, MST7 e MST9. Os resultados apontaram a ocorrência de 28 eventos genéticos, distribuídos entre deleções, inserções, variação no número de repetições em tandem e mutações pontuais (Fig.1).

O sequenciamento permite saber com exatidão o número de repetições em tandem presentes em cada sequência (Frothingham e O'Connell., 1998) e ainda determinar marcadores estáveis como SNP específicos (Gutacker *et al.*, 2006) considerados eventos genéticos de grande importância para estudos sobre filogenia. Drancourt *et al.* (2008) utilizando a região ETR-D (MST12) para diferenciar membros do complexo *M. tuberculosis* mostraram que o sequenciamento desse espaçador provou ser específico para diferenciar sete das oito espécies do grupo em uma única reação.

A região MST12 (ERT-D) neste trabalho revelou a presença de cinco alelos caracterizados por uma sequência de 40 bp em todos os isolados, seguida por 1-4 cópias de repetição em tandem de 77 bp. Também foi revelado a inserção de uma base G76, um SNP A424G, um SNP T485A e uma deleção de 18 bp após a última repetição do primeiro alelo. Esses eventos foram detectados pela comparação com o genoma da cepa AF2122/97 analisada *in silico*. Esses dados quando comparados com as sequências caracterizadas por Drancourt *et al.* (2008) disponíveis no Genbank (EU180228- EU180234) mostrou que os perfis encontrados para *M. bovis* neste estudo foram diferentes dos perfis descritos pelo autor, tanto pelo número de repetições quanto pelos SNP detectados. Um BLASTn foi realizado com as amostras *M. bovis* tipo BCG, que também apresentaram perfis diferenciados de *M. bovis* em ambos os estudos.

O MST realizado para isolados de *M. tuberculosis* contou com a análise de oito regiões espaçadoras, sendo quatro delas (MST1, MST2, MST3 e MST8) excluídas do estudo de *M. bovis* devido à baixa variabilidade apresentada pelos espaçadores. Djelouadi *et al.* (2008) identificou treze alelos nessas regiões que constituíram eventos genéticos de deleções e substituições de nucleotídeos. Os outros quatro espaçadores (MST4, MST11, MST12 e MST13) caracterizaram-se principalmente por repetições em tandem e mostraram um perfil bem diferente do encontrado para *M. bovis* nesse trabalho. Um evento observado com frequência foi a presença de uma mutação pontual na primeira base de muitas das repetições em tandem, fato que não ocorreu em nenhum dos isolados de *M. bovis* analisados no presente estudo. MST12 e MST13 foram os espaçadores que apresentaram maior número de alelos para *M. tuberculosis*, enquanto que para *M. bovis* foram o MST4 e o MST12.

O MST7 utilizado para *M. bovis* apontou cinco alelos caracterizados por 1-4 cópias de 57 pb e o MST5 revelou dois alelos, sendo um deles caracterizados por uma deleção de 67 bp, observada em apenas

quatro amostras incluindo a cepa AF2122/97. Uma análise realizada *in silico* mostrou que essa deleção foi observada também para a cepa *M. bovis* BCG Moreau RDJ, enquanto às cepas *M. bovis* BCG Tóquio 172, BCG México e BCG Pasteur 1173P2 apresentaram a região intacta, assim como os demais isolados analisados. A baixa variabilidade genética observada nos espaçadores excluídos do estudo pode estar relacionada ao viés de amostragem existente em relação às amostras de Minas Gerais e outros estados, assim como no número de isolados relativo ao ano de 2007, procedentes em sua maioria de uma única fazenda no município de Bueno Brandão. A diversidade alélica existente entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pode ser decorrente da ampla gama de hospedeiros do bacilo bovino em relação ao humano, que evoluem em ambientes distintos e sob condições distintas (Brosch *et al.*, 2002). O tamanho da população e a diversidade genética encontrada nas cepas de *M. tuberculosis* em relação ao *M. bovis* também podem ser representativos para essas diferenças.

Neste estudo foram analisadas sete regiões espaçadoras intergênicas, que associadas, permitiram organizar os isolados de *M. bovis* em diferentes complexos clonais. O uso de complexos clonais como ferramenta para análises de população é importante porque permite reconhecer subpopulações ou clones específicos que apresentam características genéticas únicas.

Epidemiologicamente, isolados relacionados são derivados da expansão clonal de um precursor único, resultando em características comuns (Milian-Suazo *et al.*, 2002). As análises pelo MST em conjunto com o *Spoligotyping* contou com 28 amostras representativas de *M. bovis* procedentes de 14 municípios, revelando 13 perfis de ST e oito espoligotipos. As análises dos dados dos isolados de *M. bovis*, relativos aos anos de 2006 e 2007 revelaram que os padrões de espoligotipos determinados para animais procedentes de uma única fazenda foram os mesmos, enquanto os perfis genotípicos gerados pelo MST foram diversificados. Os isolados de uma fazenda localizada no município de

Itabirito apresentaram o padrão de espoligotipo SB0333 e o perfil ST1 pelo MST, enquanto os isolados da fazenda do município de Bueno Brandão revelaram o espoligotipo SB1135, que foram classificados em quatro diferentes sequências tipo: ST14, ST17, ST19 e ST25 (Fig. 5). As ST14, ST19 e ST25 se mostraram estreitamente relacionadas e se posicionaram em um mesmo clado no cladograma gerado neste estudo sendo diversificadas pela variação em apenas um dos *locus*. A ST17 ficou localizada em um clado distinto e o seu perfil genotípico foi identificado em isolados de outros três municípios de Minas Gerais.

Um resultado semelhante foi observado por Figueiredo *et al.* (2011) ao realizar um trabalho para caracterizar a epidemiologia de um surto de tuberculose bovina em uma fazenda no Rio de Janeiro. As análises procederam mediante o uso das técnicas VNTR e *Spoligotyping*. As cepas agrupadas pelo *Spoligotyping* foram analisadas por VNTR para confirmar as relações clonais entre os isolados. Quatro espoligotipos foram identificados entre doze isolados analisados e dez perfis de VNTR foram revelados. A associação das duas técnicas permitiu determinar a formação de dois grupos, um com quatro e outro com dois isolados. Os seis isolados restantes foram caracterizados por apresentar um perfil genético único. Segundo Figueiredo *et al.* (2011) a heterogeneidade genética observada nas cepas deste rebanho, muito provavelmente, reflete a diversificada origem geográfica das vacas ali introduzidas. A presença de diferentes genótipos de *M. bovis* em um mesmo rebanho sugere a circulação de animais entre as regiões (Perumaalla *et al.*, 1996) ou fontes diferentes de infecção (Salamon *et al.*, 2000).

Outro evento observado foi a sequência tipo ST6, caracterizada com um único perfil genotípico, foi representada por quatro espoligotipos diferentes (SB0295, SB0333, SB0121 e SB1135) em diversos municípios (Fig. 5). É interessante notar que a localização geográfica do genótipo não é exclusiva para os perfis do MST, com

exceção dos perfis únicos que apresentaram espoligotipos únicos. O aumento da amostragem de isolados de *M. bovis* seria essencial para inferir dados mais consistentes acerca da biogeografia do bacilo bovino nessas regiões. O procedimento utilizado para esse tipo de ocorrência com a tipagem por VNTR em associação com o *spoligotyping* é reorganizar os isolados identificados pelos mesmos perfis de VNTR em grupos geograficamente localizados pelo *Spoligotyping* (Smith *et al.*, 2006), obtendo dessa forma mais dados acerca da filogenética do bacilo bovino.

Os resultados obtidos a partir da análise somente dos isolados de *M. bovis* procedentes de Minas Gerais revelaram a formação de quatro complexos clonais, sendo que o principal deles, identificado pela ST17, caracteriza um perfil genotípico apresentado por isolados de quatro municípios, localizados no Sul de Minas (Bueno Brandão), Noroeste de Minas (Lagoa Grande), Zona da Mata (Guiricema) e Triângulo Mineiro (Serra do Salitre). O segundo maior complexo foi identificado pela ST6, composta de isolados de sete municípios, localizados no Sul de Minas (Bueno Brandão), Zona da Mata (Guidoval), Triângulo Mineiro (Gurinhata e Ituiutaba) e Vale do Rio Doce (Nova Módica, Alpercata e Caratinga). Essa informação é importante porque demonstra a distribuição de isolados de *M. bovis* com os mesmos perfis genotípicos em diferentes partes do estado, o que sugere a ocorrência de trânsito de animais nessas regiões.

Foi observado, que quando a análise se estendeu a amostras representativas procedentes de outros estados do Brasil (São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul), alguns isolados apresentaram perfis genotípicos idênticos. SP foi caracterizado pelos perfis ST6, ST17 e ST58; Goiás foi representado por ST10, ST30 e ST34; PR foi caracterizado por um perfil único ST55, mas se mostrou estreitamente relacionado com amostras de MG, SP e GO; MT identificou o perfil ST6 que também se mostrou presente em amostras de SP e MG; MG contou com a

maior parte das amostras representativas neste estudo e identificou dentre outros, os perfis ST6, ST10, ST11 e ST17 (Fig. 4). A ocorrência de perfis idênticos em isolados de *M. bovis* provenientes de diferentes Estados de Minas Gerais, o que sugere a ocorrência de diferentes fontes de infecção ou o trânsito de animais nessas regiões.

Ao associar os dados da árvore filogenética com as análises realizadas pelo eBURST foi observado que as amostras se posicionaram de formas bem semelhantes no cladograma e no dendrograma gerados. O agrupamento das sequências tipo no cladograma mostrou a formação de cinco clados a partir de perfis genotípicos localizados no centro da árvore, que se mostraram estreitamente relacionados. As amostras que foram caracterizadas por um perfil único de ST, normalmente representadas por um único isolado, se mostraram ainda que distantes das outras ST, amplamente distribuídas entre todos os clados descritos e são em sua maioria procedentes de diferentes municípios. O dendrograma exibiu o mesmo resultado, porém facilitou a análise das relações evolutivas entre os isolados, uma vez que forneceu maiores informações acerca da relação da variação genotípica das sequências tipo com a formação de cada complexo clonal. A distribuição das amostras com base na localização geográfica e nos perfis únicos descritos sugere que um número maior de amostras representativas dessas regiões poderia inferir melhor a relação evolutiva do bacilo bovino neste estudo, uma vez que poderia modificar a formação dos complexos clonais fundados.

As amostras padrão de *M. bovis* foram localizadas nos clados D e E do cladograma (Fig. 6) e se mostraram relacionadas ao complexo clonal ST59 no dendrograma. Em ambos, as cepas *M. bovis* BCG CR13 (ST61) e AF2122/97 (ST63) se mostraram mais afastadas em relação ao grupo analisado, sendo as sequências tipo ST11 e ST52 as mais estreitamente relacionadas. As amostras de Bueno Brandão constituíram o município com maior número de amostras. Pelo cladograma, as

amostras foram aglomeradas em sua maioria no clado B, sendo a ST17, caracterizada como um dos perfis descritos dessa fazenda, localizada em um clado a parte. Pelo eBURST, a ST17 representou o genótipo fundador de um dos complexos clonais, sendo representado por boa parte dos isolados desse município. O elevado número de isolados dessa região poderia ser um viés de amostragem, influenciando a formação de um dos principais complexos clonais fundados.

Os resultados obtidos pela análise da região de diferença RDEu1 detectou quatro isolados de *M. bovis*, ambos procedentes de Minas Gerais, como sendo membros do complexo clonal Eu1 de importância global. O espótipo descrito para esses isolados foram SB0333 identificados pela sequência tipo ST1, e o SB0267 identificado pela ST11. A variação alélica existente entre esses isolados foi observada em apenas um *locus* caracterizado pela região espaçadora MST4, representada geneticamente pela variação no número de repetições em tandem. O SB1033 apresentou a ausência dos espaçadores 3, 6, 8-12, 16, 34 e 39-43, enquanto o SB0267 revelou a ausência dos espaçadores 3, 5, 9, 11, 16,19 e 39-43, confirmando a ausência do espaçador 11 que segundo Smith *et al.* (2011) caracteriza os membros do complexo clonal Eu1. Segundo o banco de dados do *spoligotyping* (<http://www.mbovis.org>) há registro de ocorrência do espótipo SB0333 na Holanda e do SB0267 na República Tcheca e Eslováquia (Pavlik *et al.*, 2003), África do Sul (Michel *et al.*, 2008) e Espanha (Rodriguez *et al.*, 2009). Não foram encontrados na literatura relato desses padrões de espótipo no Brasil.

As regiões espaçadoras propostas para realização do MST para isolados de *M. bovis* foram as mesmas propostas por Djelouadji *et al.* (2008) ao aplicar a técnica para isolados de *M. tuberculosis*. Essa decisão foi tomada com base na similaridade genética de 99,95% existente entre essas duas espécies. Os marcadores utilizados foram procedentes de regiões intergênicas, susceptíveis a maiores taxas de mutação devido a baixa pressão seletiva

existente. Como o bacilo bovino apresenta uma ampla gama de hospedeiros em relação ao bacilo humano e a evolução entre eles procede sob condições distintas, sugere-se que a seleção de novos espaçadores para a aplicação do MST para *M. bovis* seja realizada com base na análise da cepa *M. bovis* AF2122/97. As análises acerca da filogenia do bacilo bovino mostram que os isolados de *M. bovis* vêm sofrendo mudanças evolutivas em diferentes regiões ao longo dos anos.

A análise pelo MST demonstra que a amostragem precisa ser aumentada para fornecer dados complementares que possibilitem acompanhar a formação dos complexos clonais e a expansão dos mesmos de acordo com a localização e a data. Este foi o primeiro trabalho a identificar a variabilidade dos isolados de *M. bovis* pelo método MST. Os resultados indicaram que o método funciona, uma vez que permitiu tipar e diferenciar isolados de *M. bovis*, a partir da análise do sequenciamento de poucas regiões espaçadoras, mesmo em localizações restritas e em um período de tempo curto como foi verificado no município de Bueno Brandão. As sequências representativas de cada alelo obtidas pelo sequenciamento das regiões espaçadoras podem ser disponibilizadas em banco de dados públicos para comparação de análises futuras.

6. CONCLUSÕES

A genotipagem de *M. bovis* pelo MST para mostrou que os resultados obtidos podem contribuir com estudos epidemiológicos acerca do bacilo bovino. O método se mostrou eficiente para detectar a variabilidade genética presente nas sequências analisadas e para inferir relações evolutivas em curto prazo do bacilo bovino. O método também se mostrou adequado para correlacionar localização geográfica e dados filogenéticos dos isolados de *M. bovis* utilizados neste estudo.

Acredita-se que novos espaçadores desenhados a partir da cepa padrão *M.*

bovis AF2122/97 possam detectar regiões mais variadas no genoma do *M. bovis*, aumentando a discriminação entre os isolados.

O aumento da amostragem é sugerido, uma vez que poderia contribuir para um melhor entendimento acerca da formação e expansão dos complexos clonais fundados no estudo. O uso do *spoligotyping* associado ao MST contribuiu com as análises acerca da biogeografia do bacilo bovino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, R.M.C.M. *Tuberculose humana causada pelo Mycobacterium bovis: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais*. 1998. 17f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Bacteriosis y micosis*. Washington: OPAS. 2001. v.1. 416p.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Bacteriosis: tuberculosis zoonótica*. Genova; OMS, 1986. p.174-185.
- AMADIO, A.; ROMANO, M.I.; BIGI F. *et al*. Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, n. 5, p. 2481-2484, 2005.
- ANDERSSON S. G.; ZOMORODIPOUR A.; ANDERSSON J. O. *et al*. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, v. 396, n. 6707, p. 133-140, 1998.
- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; PICKERING, X. *et al*. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *Vet. Rec.*, v. 138, n. 12, p. 276-280, 1996.
- ASHFORD, D. A.; WHITNEY, E.; RAGHUNATHAN, P. *et al*. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech.*, v. 1, p. 325–337, 2001.
- BAPTISTA, F.; MOREIRA, E. C.; SANTOS, W. L. M. *et al*. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, v. 56, n. 5, p.577-580, 2004.
- BAPTISTA, I. M. F. D. *Tipagem molecular de cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas de pacientes HIV soropositivos e soronegativos na região de Bauru, São Paulo*. 2001. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.
- BELCHIOR, A.P.C. *Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais*. 2001. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BENET, J. J. Epidémiologie de la tuberculose bovine em France: état des connaissances et perspectives. *Le Point Veter.*, v. 26, p. 13-26, 1994.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J. *et al*. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, v. 36, p. D25–D30, 2008.
- BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; MÜLLER, B. *et al*. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. *J. Bacteriol.*, v. 193, n. 3, p. 670-678, 2011.

- BERGEY, D.H.; HARRISON, F.C.; BREED, R.S. *et al. Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: The William & Willis, Baltimore.1923.
- BONIOTTI, M. B.; GORIA, M.; LODA, D. *et al.* Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v.47, n.3, p.636-644, 2009.
- BOVINE tuberculosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5ed. Paris: OIE, 2004. Cap. 2.3.3. p. 489-502.
- BOVINE tuberculosis. Iowa State University, 2007, p. 1-6.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e a Tuberculose Animal (PNCEBT)*:Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 184p. (Manual técnico).
- BRENNER, D.; STALEY, J.; KRIEG, N. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. In: CLASSIFICATION of prokaryotic organisms and the concept of Bacterial speciation. New York, NY:Springer. 2005, v. 2, 304 p.77 illus.
- BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n.6, p. 3684-3689, 2002.
- COHAN, F. M. What are bacterial species? *Annu rev microbiol*, v.56, p.457-87, 2002.
- COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, v.151, n.1-2, p.2-7, 2011.
- COLLINS, D. M. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, v. 81, n. 2, p. 97-102, 2001.
- COMAS, I.; GAGNEUX, S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 5, p. e1000600, 2009.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet.Microbiol.*, v.40, n. 1-2, p.53-63, 1994.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: Varela, 1992.843p.
- COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J. *et al.* Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg. Infect. Dis.*, v.4, n. 1, 59-70, 1999.
- COUSINS, D.; WILLIAMS, S.; LIÉBANA, E. *et al.* Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 1, p. 167-178, 1998.
- COWAN L. S.; DIE L.; MONSON .; WAN, P. *et al.* Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 688–695, 2005.
- COWAN L. S.; MOSHER L.; DIEM L. *et al.* Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 5, p.1592-1602, 2002.
- DJELOUADJI, Z.; ARNOLD, C.; GHARBIA, S. *et al.* Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *PLoS one*, v. 3, n. 6, e2433, 2008.
- DRANCOURT, M. A. Single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *Distribution*, v. 2, n. 6, p.1-8, 2008.

- DRANCOURT, M.; ROUX, V.; DANG, L. V. *et al.* Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and Plague Pandemics. *Emerg. Infect. Dis.*, v.10, n.9, p.1585-1592, 2004.
- DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T. *et al.* Bovine tuberculosis transmission between domestic and feral species in Portugal : first molecular evidences in *Mycobacterium bovis* isolates from a farm in Alentejo. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v. 102, n. 563-564, p. 299-303, 2007.
- DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; AMADO, A. *et al.* Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.*, v.130, n.3/4, p. 415-421, 2008.
- EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H., *et al.* Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, v. 16, n. 5, p. 977-981, 1990.
- EPPLEN, C.; SANTOS, E. J.; MAUELER, W.; *et al.* On simple repetitive DNA sequences and complex diseases. *Electrophoresis*, v.18, p.1577-1585, 1997.
- FEIL, E. J., LI, B. C., AANENSEN, D. M., HANAGE, W. P. *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Society*, v.186, n.5, p.1518-1530, 2004.
- FIGUEIREDO, G. S.; REIS, A. C. M., CASTRO, A. S. *et al.* Reação de Sequenciamento de DNA e purificação: protocolos otimizados. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1ed. Brasília, DF, 2003. 4p. (Circular técnica 22).
- FIGUEIREDO, E. E. D. S.; RAMOS, D. F.; MEDEIROS, L. *et al.* Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. *Vet.J.*, p.10-12, 2011.
- FILLIOL, I.; FERDINAND, S.; SOLA, C. *et al.* Spoligotyping and IS6110-RFLP typing of *Mycobacterium tuberculosis* from French Guiana: a comparison of results with international databases underlines interregional transmission from neighboring countries. *Res Microbiol.*, v. 153, n. 2, p. 81-88, 2002.
- FINE, P.E.M. Immunities in and to tuberculosis: implications for pathogenesis and vaccination. In: Porter JDH, McAdam KPWJ, eds. *Tuberculosis: back to the future*. Chichester: John Wiley, 1994. p. 53-78.
- FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am. J. Epidemiol.*, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.
- FRANCISCO, A. P.; BUGALHO, M.; RAMIREZ, M. *et al.* Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinfo.*, v. 10, n. 152, p. 1-15., 2009.
- FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol.*, v. 144, p.1189-1196. 1998.
- GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.
- GORDON, S. V.; BROSCH, R.; BILLAULT, A. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.*, v. 32, n. 3, p. 643-655, 1999.
- GRANGE, J. M.; YATES, M. D.; KANTOR, I. N. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2 ed. Geneva, Switzerland.WHO/MC/ZOO 96.4. 1996.

- GROENEN, P.M.; BUNSCHOTEN, A.E.; VAN SOOLINGEN. *et al.* Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.*, v. 10, n. 5, p.1057–1065, 1993.
- GUTACKER, M. M.; MATHEMA, B.; SOINI, H. M. *et al.* Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J. Infect. Dis.*, v. 193, n. 1, p. 121–128, 2006.
- GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R. *et al.* Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, v.1, n.1, e5, 2005.
- HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res. Vet. Sci.*, v. 76, n.1, p. 1-18, 2004.
- HADDAD, N.; OSTYN, A.; KAROUI, C. *et al.* Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* v. 39, n. 10, p. 3623–3632, 2001.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M. *et al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.*, v. 59, p. 2695–2705, 1991.
- HUNTER, P.R.; M.A. GASTON. Numerical index of the discriminatory ability of typing system: an application of simpsons index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.
- JOLLEY, K. A.; FEIL, E. J.; CHAN, M. S. *et al.* Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinf. Applic. Note*, v. 17, n. 12, p. 1230-123, 2001.
- JUNIOR, M. E. K.; SOUZA, C. L.M. Considerações sobre a tuberculose bovina no norte fluminense e no município de campos dos goytacazes após o advento do pncbet – programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose bovina. *Medicina*, v. 2, n. 8, p. 138-148, 2008.
- KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A. *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.
- KANTOR, I.N. *Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal*. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis. 1988. 63p. (Nota técnica, n. 11).
- KENT, P.T.; KUBICA, G.P. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control. 1985. 207p.
- KREMER K.; ARNOLD C.; CATALDI A. *et al.* Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 11, p. 5628-5638, 2005.
- LE FLÈCHE, P.; FABRE, M.; DENOEUDE, F. *et al.* Highresolution, on-line identification of strains from *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.*, v. 2, n. 37, p. 37–48, 2002.
- LE FLÈCHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L. *et al.* A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *B.M.C. Microbiol.*, v.1, n. 2, 2001.

- LEE, A. S.; TANG, L. L.; LIM, I. H. *et al.* Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 657-659, 2002.
- LI, W.; CHOMEL, B. B., MARUYAMA, S. *et al.* Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 7, p. 2499-2506, 2006.
- LOPES FILHO, P.R. *Perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008.* 2010.41p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MANUAL de Bacteriologia da Tuberculose. ed. Rio de Janeiro: Fundação Nacional de Saúde, 2005. 239p.
- MANUAL de bacteriologia da tuberculose. 2.ed. Rio de Janeiro; Fundação Nacional de Saúde, 1994; 115p.
- MANUAL de zoonoses: programa de zoonoses região sul. São Paulo; Ed. Ateneu, 2009, v.1, 166p.
- MARQUES, A. M. C; CUNHA, R. V. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiwá no Município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, n. 5, p. 1405-1411, 2003.
- MAYNARD SIMTH, J.; SMITH, N. H. Detecting recombination from gene trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 15, n. 5, p. 590-599, 1998.
- MICHEL, A. L.; HLOKWE, T. M.; COETZEE, M. L. *et al.* 2008. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Vet. Microbiol.*, v.126, n.1-3, p. 151-159, 2008.
- MILIÁN-SUAZO, F.; BANDA-RUÍZ, V.; RAMÍREZ-CASILLAS, C. *et al.* Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Prev. Vet. Medic.*, v. 55, n. 4, p. 255-264, 2002.
- MOKADDAS, E.; AHMAD, S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *J. Infect. Dis.*, v. 60, n. 2-3, p. 140-144, 2007.
- MORRIS, R. S.; PFEIFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.*, v. 40, n. 1-2, p. 153-177, 1994.
- MOSTOWY, S.; INWALD, J.; GORDON, S.; *et al.* Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *Society*, v.187, n. 18, p. 6386-6395, 2005.
- MOTA, P. M. P. C. *Estudo da Esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas da tuberculose bovina.* 1985, 70p. Tese (Mestrado), Escola de Medicina Veterinária. UFMG, Belo Horizonte, MG.
- MUDANÇAS na legislação sanitária ampliam mercado para pequenos. *Globo Rural*, n. 239, set. 2005. Disponível em: [http:// globorural.globo.com/edic/239/rep_pecuariaa.htm](http://globorural.globo.com/edic/239/rep_pecuariaa.htm)>. Acesso em: 15 set. 2011.
- MÜLLER, B.; HILTY, M.; BERG, S. *et al.* African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 6, p. 1951-60, 2009.
- NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P. *et al.* Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, v. 235, n. 4796, p. 1616-1622, 1987.

- NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B. *et al.* Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, v. 76, n. 1, p. 1-46, 1995.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Situación de la tuberculosis bovina en la América. Washington, D. C., 1995 (RIMS A 9, Informativo 26).
- PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B. *et al.* Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 3, p. 251- 257, 2007.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H., VELÁSQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of the genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.*, v. 9, p. 1132–1147, 2009.
- PERUMAALLA, V.S.; ADAMS, L.G.; PAYEUR, J. B. *et al.*, 1996. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p. 2066–2071, 1996.
- POSADA, D. M.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.
- PRICE-CARTER M.; ROOKER S.; COLLINS D. M. Comparison of 45 variable number tandem repeat (VNTR) and two direct repeat (DR) assays to restriction endonuclease analysis for typing isolates of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol.*, v. 150, n. 1-2, p. 107-114, 2011.
- REBANHO bovino nacional cresce 2,1% e chega a 209,5 milhões de cabeças. IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&idpagina=1>. Acessado em 10 jan. 2012.)
- REDDINGTON, K.; O'GRADY, J.; DORAI-RAJ, S. *et al.* A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS one*, v. 6, n. 8, e23481, 2011.
- REYES, J. F.; CHAN, C. H. S.; TANAKA, M. M. Infection, Genetics and Evolution Impact of homoplasmy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Gen. Evol.*, v. 12, n. 4, p. 811-818, 2011.
- RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. *et al.* Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. *Arq.Inst.Biológ.* v. 71, n. 1, p. 277-282, 2004.
- RODRÍGUEZ, S.; ROMERO, B.; BEZOS, J. *et al.* High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet. Microbiol.*, v. 141, n. 2, p. 89-95, 2009.
- RODRIGUEZ, S.; ROMERO, B.; BEZOS, J. *et al.* High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet.Microbiol.* v. 141, n. 1-2, p. 89–95, 2010.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SCHÜRCH, A. C.; DALE, J. *et al.* European 2 - A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect. Genet. Evol.*, v. 12, n. 4, p.866-872, 2011.
- RODWELL, T.C.; MOORE, M.; MOSER, K. S. *et al.* Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 6, p. 909-916, 2008.
- RORING, S.; SCOTT, A.N.; HEWINSON, R. G. *et al.* Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet. Microbiol.*, v. 101, n. 1, p. 65–73, 2004.

- ROSENBERGER, G. *Enfermidades de los bovinos*. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sul S.A., 1989. v. 2, p.139-151, 1989.
- ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Rev. Ciênc. Farm.*, v. 18, n. 1, p. 101-108, 1997.
- RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A. *et al.* Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arq. Inst. Biol.*, v.74, n.1, p.55-65, 2007.
- SALAMON, H.; KATO-MAEDA, M.; SMALL, P. M. *et al.* Detection of Deleted Genomic DNA Using a Semiautomated Computational Analysis of GeneChip Data. *Gen. Res.*, v. 10, n. 12, p. 2044-2054, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3. 3104p.
- SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T. *et al.* Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *Fems. Microbiol. Rev.*, v. 24, n. 5, p. 647-660, 2000.
- SILVA, K. P. C.; PORTO, W. J. N.; MELO, V. S. *et al.* Diagnóstico da situação da tuberculose no estado de Alagoas e fatores de risco associados à infecção pelo *Mycobacterium bovis* em bovinos destinados a produção de leite e carne. 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011, Florianópolis. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, n. 885, 3p.
- SINHA, R.N. *The significance of pathogenic microorganisms in raw milk*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1964. p. 117-167.
- SMITH, N. H.; BERG, S.; DALE, J. *et al.* European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Genet. Evol.*, v. 11, n. 6, p. 1340-1351, 2011.
- SMITH, N. H.; DALE, J.; INWALD, J. *et al.* The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, n. 25, p. 15271-15275, 2003.
- SMITH, N. H.; GORDON, S. V.; DE LA RUA-DOMENECH, R. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Rev. Microbiol.*, v. 4, n. 9, p. 670-81, 2006.
- SMITH, N.H. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect. Genet. Evol.*, v. 12, n. 4, p. 857-865, 2011.
- SOLA, C.; DEVALLOIS, A; HORGEN, L. *et al.* Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 5, n. 3, p. 404-14, 1999.
- SOLA, C.; FILLIOL, I.; GUTIERREZ, M.C. *et al.* Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: Biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 7, n. 3, p. 390-396, 2001.
- SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.*, v. 249, n. 1, p. 1-26, 2001.
- SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E. *et al.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 94, n.18, p. 9869-9874, 1997.
- STEAD, W. W.; EISENACH, K. D.; CAVE, M. D. *et al.* When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 151, n. 4, p. 1267-1268, 1995.
- SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; *et al.* Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbio.*, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

- SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E. *et al.* Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Society*, v. 39, n.10, p. 3563-3571, 2001.
- SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIMPENS, C.; *et al.* Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol. Microbiol.*, v. 26, n. 5, p. 991-1003, 1997.
- SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S. *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, v.36, n.3, p.762-771, 2000.
- SUPPLY, P.; WARREN, R. M.; BANULS, A. L. *et al.* Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol. Microbiol.*, v. 47, p. 529–538, 2003.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic. Acids. Res.*, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 4, n. 6, p. 832-837, 1994.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1998.
- TORTOLI, E. Infection, genetics and evolution phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. *Infect. Gen. Evol.*, 2011. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.025.
- TSCHOPP, R., BOBOSHA, K., ASEFFA, A. *et al.* Bovine tuberculosis at a cattle-small ruminant-human interface in Meskan, Gurage region, Central Ethiopia. *BMC. Infect. Dis.*, v.11, n. 318, p. 1-14, 2011.
- TURNER, K. M. E.; HANAGE, W. P.; FRASER, C. *et al.* Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry. *BMC. Microbiol.*, v.7, n. 30, p.1-14, 2007.
- VAN BELKUM A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 2, n. 3, p. 306-311, 1999.
- VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN ALPHEN, L.; *et al.* Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 2, p. 275-293, 1998.
- VAN EMBDEN, J.D.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T. *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.
- VAN SOOLINGEN, D.; BORGDORFF, M. W, DE HAAS P. E. *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J. Infect. Dis.*, v. 180, n. 3, p.726-736, 1999.
- VIANA-NIERO, C.; GUTIERREZ, C.; SOLA, C. *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 57-65, 2001.
- ZAKHAM, F., BELAYACHI, L., USSERY, D. *et al.* Mycobacterial species as case- study of comparative genome analysis. *Cell. Mol. Biol.*, v. 57, n. 25, 2011.
- ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C, LOPES., M.T.P., *et al.* *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswald Cruz*, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001.