

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GENOTIPAGEM E PESQUISA DE RESISTÊNCIA
FENOTÍPICA E GENÉTICA À RIFAMPICINA E
ISONIAZIDA EM LINHAGENS DE *MYCOBACTERIUM*
BOVIS ISOLADAS DE LINFONODOS DE BOVINOS DE
ABATEDOURO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO

MARÍLIA MASELLO JUNQUEIRA FRANCO

Botucatu, SP

agosto/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GENOTIPAGEM E PESQUISA DE RESISTÊNCIA
FENOTÍPICA E GENÉTICA À RIFAMPICINA E
ISONIAZIDA EM LINHAGENS DE *MYCOBACTERIUM*
BOVIS ISOLADAS DE LINFONODOS DE BOVINOS DE
ABATEDOURO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO

MARÍLIA MASELLO JUNQUEIRA FRANCO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Paes

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Franco, Marília Masello Junqueira.

Genotipagem e pesquisa de resistência fenotípica e genética à rifampicina e isoniazida em linhagens de *Mycobacterium bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro na região centro-oeste do estado de São Paulo / Marília Masello Junqueira Franco. – Botucatu, 2016

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Paes

Coorientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502000

1. Tuberculose em bovino. 2. Genes MDR. 3. Técnicas de Genotipagem. 4. Tipagem molecular 5. Tuberculose Resistente a Múltiplos Medicamentos.

Palavras-chave: MDR-TB; MIRU-VNTR; Spoligotyping; multidroga-resistente; tuberculose bovina.

Marília Masello Junqueira Franco

GENOTIPAGEM E PESQUISA DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENÉTICA À RIFAMPICINA E ISONIAZIDA EM LINHAGENS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ISOLADAS DE LINFONODOS DE BOVINOS DE ABATEDOURO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes _____

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Tit. Hélio Langoni _____

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa _____

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Lavras - UFLA – Lavras/MG

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto _____

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo/SP

Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa _____

Membro Titular

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente/SP

Prof. Dr. Christian Hirsch

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Lavras – UFLA – Lavras/MG

Defesa de tese: 12 agosto de 2016. Local: FMVZ/UNESP – *Campus* de Botucatu/SP.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades oferecidas, por sempre guiar meu caminho nos momentos felizes e nos tristes, com saúde para viver plenamente.

Aos meus pais, José Eduardo Junqueira Franco e Maria Antonieta Schutzer Masello Junqueira Franco, os maiores exemplos de caráter, honestidade e amor incondicional que tenho na vida. Aos meus irmãos, Mariana Masello Junqueira Franco e Fernando Masello Junqueira Franco, meus eternos companheiros. Aos meus primos e tios queridos, que fortalecem o alicerce da nossa família, e só reforçam o sentimento de amor entre nós.

Ao meu noivo Marcelo Simões Mendes, por seu amor, carinho, compreensão e companheirismo. Sua presença foi fundamental nessa etapa, e tenho certeza, que também será em muitas outras que virão na minha vida.

Ao meu orientador, prof. Dr. Antônio Carlos Paes, por sempre estar à disposição para ouvir e transmitir seus conhecimentos. Obrigada por confiar na minha capacidade e pela oportunidade de ser sua orientada de residência, especialização, mestrado e doutorado.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pelos ensinamentos desde a residência e a especialização, pelo seu empenho e dedicação durante meu mestrado e doutorado, além de toda a ajuda cotidiana. Sinto-me muito honrada em poder contar com dois excelentes docentes ao meu lado em todas estas etapas.

Ao Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja, por todos os ensinamentos e pelo convite para acompanhá-lo na disciplina de Epidemiologia e Saneamento do Curso de Medicina Veterinária da FMVZ-UNESP campus Botucatu. Foi um período de muito aprendizado, contando com sua atenção e dedicação para que eu pudesse melhorar nas atividades relativas à docência. Muito obrigada pela confiança no meu trabalho.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o doutorado, os quais forneceram base teórica para minha evolução profissional. Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja, Prof. Raimundo Souza Lopes, Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira, Prof. Dr. Germano Francisco Biondi, Prof.

Dr. Alexandre Secorun Borges, Profa. Tit. Jane Megid, Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato, Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, muito obrigada!

Agradeço a todos os colaboradores do projeto: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes, Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, Marcelo Miyata, Prof. Dr. Marcos Brian Heinemann, Antonio Francisco de Souza Filho, Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso, Aryadne Larissa de Almeida. Em diferentes etapas, todos foram fundamentais para a realização do experimento e concretização da tese. Minha eterna gratidão!

Aos professores componentes da banca examinadora da tese: Prof. Dr. Antônio Carlos Paes, Prof. Tit. Hélio Langoni, Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa, Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa, Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues, Prof. Dr. Rogério Giuffrida e Prof. Dr. Christian Hirsch. São exemplos profissionais que tenho grande admiração.

A todos os professores, funcionários e residentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP campus Botucatu. Em especial ao técnico Fernando José Paganini Listoni e aos colegas do Laboratório de Microbiologia. A boa convivência com vocês tornou o cotidiano de trabalho mais leve e agradável.

Aos meus colegas de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu. Em diferentes áreas do conhecimento, além de nos complementarmos profissionalmente, também fomos descobrindo afinidades pessoais e amizades ao longo da trajetória de estudos. Obrigada pela convivência nesses anos.

Aos integrantes do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ-UNESP campus Botucatu, nos mandatos de 2013 a 2015. Foram anos de muito aprendizado e experiência ao lado de vocês, sempre visando a melhoria do programa de pós-graduação e da instituição.

Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (processo FAPESP

2014/04929-7), indispensável para minha manutenção em Botucatu, dedicação exclusiva às atividades de pesquisa e apoio financeiro à execução do projeto.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os amigos que estiveram ao meu lado nesta fase e nas anteriores. Considero-me abençoada por ter conhecido e permanecido com o carinho de pessoas muito especiais que Botucatu me deu ao longo destes anos. Todos vocês, cada um a seu modo, entraram na minha vida e deixaram marcas positivas. Em especial Claudenice Batista de Barros, embora você saiba que as palavras não são necessárias para agradecer.

São muitas pessoas pelas quais sinto gratidão, saibam que vocês são todos muito importantes. Muito obrigada!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”
(Le Petit Prince - Antoine de Saint-Exupery)

Com meu carinho e sinceridade.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sequência de sondas de DNA e concentrações de uso na técnica de *Spoligotyping* em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 40
- Tabela 2. Sequência de iniciadores utilizados na amplificação dos *loci* na técnica de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing* (MIRU-VNTR) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 43
- Tabela 3. Concentrações finais de diluição (expressas em µg/mL) em meio Middlebrook 7H9 dos fármacos utilizados na técnica de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015 45
- Tabela 4. Informação genotípica de 67 linhagens de *M. bovis* em *clusters*, genotipadas pelas técnicas de *Spoligotyping* e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing* (MIRU-VNTR), isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 50
- Tabela 5. Classificação qualitativa (com respectivos pontos de corte) e concentrações inibitórias mínimas (CIM, expressas em µg/mL) da sensibilidade à isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) obtidas pela técnica de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA), em isolados de *M. bovis* obtidos de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa construído utilizando o *Google Maps*[®] indicando as diferentes cidades de origem das amostras de linfonodos colhidas em abatedouro para o diagnóstico da tuberculose. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 36
- Figura 2. Microplaca de 96 poços utilizada na técnica de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 46
- Figura 3. Representação esquemática (esquerda) e resultados de hibridização do *kit* GenoType MTBDR*plus* versão 2.0 em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bTB – *bovine tuberculosis* (tuberculose por *Mycobacterium bovis*)

% - porcentagem

M. bovis – *Mycobacterium bovis*

MDR-TB – *multidrug-resistant tuberculosis*

XDR-TB – *extensively drug-resistant tuberculosis*

TDR-TB – *totally drug-resistant tuberculosis*

INH – isoniazida

RMP – rifampicina

Spoligotyping – *Spacer Oligonucleotide Typing*

MIRU-VNTR – *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing*

REMA – *Resazurin Microtiter Assay Plate*

MIRU – *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*

MIT – *MIRU International Type*

SIT – *Spoligotyping International Type*

MTBC – *Mycobacterium tuberculosis complex*

WHO – *World Health Organization*

HIV – *human immunodeficiency virus*

RR-TB – *rifampicin-resistant tuberculosis*

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

M. africanum – *Mycobacterium africanum*

BCG – bacilo de Calmette-Guérin

M. caprae – *Mycobacterium caprae*

PZA – pirazinamida

ETB – etambutol

EUA – Estados Unidos da América

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

16S rRNA – ácido ribonucleico ribossomal 16S

DNA – ácido desoxirribonucleico

DR – *direct repeat*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

MABA – *Microplate Alamar Blue Assay*

ATCC – *American Type Culture Collection*

CIM – concentração inibitória mínima

RNA – ácido ribonucleico

LPA – *Line Probe Assay*

KatG – catalase-peroxidase

InhA – enoil-ACP-redutase

NAD – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

Ser – serina

Thr – treonina

E. coli – *Escherichia coli*

SIF – Serviço de Inspeção Federal
SP – São Paulo
°C – graus Celsius
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
mL - mililitro
NaOH – hidróxido de sódio
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
pH – potencial hidrogeniônico
g – força de gravidade terrestre
µL – microlitro
Tris – tris(hidroximetil)aminometano
HCl – ácido clorídrico
FCFar – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
pb – pares de bases
UEM – Universidade Estadual de Maringá
PR – Paraná
EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide
SSPE – salina-sódio fostato-EDTA
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
M – molar
mM – milimolar
nM – nanomolar
NaCl – cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – fosfato monossódico
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
pMol - picomol
SDS – dodecil sulfato de sódio
PVC – policloreto de polivinila
µg – micrograma
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
mg – miligrama
DMSO – dimetil-sufóxido
µm – micrômetro
OADC – ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
CO₂ – gás carbônico
nm- nanômetro
AM-A – solução de amplificação A
AM-B – solução de amplificação B
DEN – solução de desnaturação
HYB – solução de hibridização
STR – solução de lavagem adstringente
RIN – solução de enxague
CON-C – conjugado streptavidina-fosfatase alcalina
CON-D – solução diluente da streptavidina-fosfatase alcalina
SUB-C – substrato corante
SUB-D – solução diluente do substrato corante

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Diagnóstico laboratorial das micobactérias	25
2.2 Fármacos utilizados no estudo	29
2.2.1 Isoniazida (INH)	29
2.2.2 Rifampicina (RMP)	31
3.OBJETIVOS	34
4.MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Delineamento experimental	35
4.2 Obtenção das amostras	35
4.3 Procedimentos laboratoriais	37
4.3.1 Descontaminação das amostras	37
4.3.2 Cultivo microbiológico das amostras	37
4.3.3 Estoque dos micro-organismos	38
4.3.4 Identificação molecular dos micro-organismos.....	38
4.3.5 Genotipagem das linhagens de <i>M. bovis</i>	39
4.3.5.1 Técnica de <i>Spoligotyping</i>	39
4.3.5.2 Técnica de MIRU-VNTR	42
4.3.6 Testes fenotípicos de resistência à INH e RMP nas linhagens de <i>M. bovis</i>	44
4.3.7 Pesquisa de mutações nos genes de resistência à INH e RMP nas linhagens de <i>M. bovis</i>	46
5.RESULTADOS	49
6.DISSCUSSÃO	53
7.CONCLUSÕES	59
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9.TRABALHO CIENTÍFICO.....	78

FRANCO, M. M. J. Genotipagem e pesquisa de resistência fenotípica e genética à rifampicina e isoniazida em linhagens de *Mycobacterium bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro na região centro-oeste do estado de São Paulo. Botucatu, 2016. 103p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

A tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* (bTB) é uma zoonose de distribuição mundial com ampla gama de hospedeiros. Nos países onde a bTB é prevalente, 10 a 20% dos casos de tuberculose humana são causados por *M. bovis*. São escassos em todo o mundo estudos que investigam a resistência à isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) em linhagens de *M. bovis* de origem bovina, reservatórios silvestres, e em casos humanos de tuberculose. Foi investigada a diversidade genotípica de 67 linhagens de *M. bovis* isoladas de bovinos de abatedouro, obtidas de 100 linfonodos com lesão caseosa, pelas técnicas de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR, bem como foi determinado o perfil fenotípico de resistência à INH e RMP pela técnica de REMA, e pesquisadas possíveis bases genéticas para resistência aos antimicrobianos. Dentre os isolados, 11 (16%) foram classificados como MDR-TB, 8 (12%) resistentes à INH e 2 (3%) resistentes à RMP. A pesquisa pelo GenoType MTBDR_{plus} ver. 2.0 não acusou a presença de mutações em nenhum dos isolados fenotipicamente resistentes. Foram identificados 16 spoligotipos entre as linhagens. A subfamília BOV_1 predominou com 52 (77,6%) isolados, com os SIT 481, 482, 594, 665, 691, 698, 1021, 1667, 1852, 2141 e dois isolados sem *shared type*. A BOV_2 foi identificada em 8 (11,9%) isolados, com o SIT 683. Os SIT 982, 1851 e 1853 foram agrupados na família BOV. Dois isolados não foram classificados em família ou subfamília. A análise de MIRU-VNTR com painel de 12 MIRUs, identificou 31 isolados pertencentes ao MIT 49, um ao MIT 5 e 35 “órfãos”. A junção das análises de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR possibilitou o agrupamento dos isolados em 12 *clusters* (contendo, ao todo, 46 isolados) e 21 isolados diferenciados em perfis únicos. Ressalta-se a elevada frequência de *M. bovis* nos linfonodos processados, e a multirresistência de certas linhagens a fármacos de primeira linha utilizados no tratamento humano da tuberculose, fato que gera preocupações em saúde pública. Futuros estudos são necessários para elucidar as bases da resistência aos fármacos e a ocorrência da diversidade genotípica em linhagens de *M. bovis* de origem bovina.

Palavras-chave: tuberculose bovina, MDR-TB, MIRU-VNTR, *Spoligotyping*

FRANCO, M. M. J. Genotyping and screening of phenotypic and genetic resistance to rifampicin and isoniazid in *Mycobacterium bovis* strains isolated from bovine lymph nodes from slaughterhouse in midwestern region of Sao Paulo State. Botucatu, 2016. 103p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* (bTB) is a zoonosis of worldwide distribution with broad host range. In countries where bTB is prevalent, 10-20% of the human cases of tuberculosis are caused by *M. bovis*. All over the world there are few studies investigating the resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) in *M. bovis* strains from cattle, wild reservoirs, and human cases of tuberculosis. The genotypic diversity of 67 *M. bovis* strains obtained out of 100 lymph nodes with caseous lesions from slaughtered animals was investigated by Spoligotyping and MIRU-VNTR techniques, as well as the assessment of their phenotypic profile of resistance to INH and RMP by REMA method and the search of possible genetic basis for antimicrobial resistance. Among the obtained isolates, 11 (16%) were classified as MDR-TB, 8 (12%) INH-resistant and 2 (3%) RMP-resistant. The use of GenoType MTBDR $plus$ ver. 2.0 did not pointed the presence of genetic mutations in any of the phenotypically resistant isolates. Sixteen different spoligotype patterns were identified. The BOV_1 subfamily predominated with 52 (77.6%) isolates, with SITs 481, 482, 594, 665, 691, 698, 1021, 1667, 1852, 2141 and two isolates without a given SIT. BOV_2 was identified in 8 (11.9%) isolates, within SIT 683. The SITs 982, 1851 and 1853 were grouped in BOV family. Two isolates were not classified in family or subfamily. The MIRU-VNTR analysis using the 12 classical MIRUs, identified a cluster of 31 isolates belonging to the MIT 49, one on MIT 5 and 35 "orphans" isolates. The combination of Spoligotyping and MIRU-VNTR analysis allowed the grouping of the isolates in 12 clusters (containing, in total, 46 isolates) and 21 isolates with unique profiles. The study highlights the high frequency of *M. bovis* among the sampled lymph nodes, emphasizing the impact of the pathogen as the causal agent of lymphadenitis and tuberculosis in cattle herds in the study area. In addition, points up the multidrug-resistance of *M. bovis* lineages to first-line drugs used in the human treatment of tuberculosis, a fact that raises public health concerns. Further studies are required to elucidate the basis of drug resistance and the occurrence of genotypic diversity in *M. bovis* strains.

Key words: bovine tuberculosis, MDR-TB, MIRU-VNTR, Spoligotyping

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex* – MTBC). A doença apresenta distribuição mundial e afeta humanos, animais domésticos e silvestres. É considerada atualmente pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) uma doença re-emergente, representando o principal problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e potencial problema em países desenvolvidos (HOLLOWAY et al., 2011; WHO, 2015).

O MTBC, considerado um dos grupos de patógenos bacterianos mais bem-sucedidos em termos evolutivos, é composto por espécies e subespécies intimamente relacionadas, as quais vem acometendo humanos e animais há milhares de anos (FITZGERALD e MUSSER, 2001). Raras enfermidades têm mantido um contato tão duradouro e impactante com a humanidade como a tuberculose. Tal inter-relação é evidenciada por estudos arqueológicos, paleopatológicos e, mais recentemente, com base nas mais modernas técnicas moleculares, que certificam a origem pré-histórica da doença (DJELOUADJI et al., 2011; HOLLOWAY et al., 2011; GALAGAN, 2014).

Mesmo diante de origem tão remota, até os dias atuais a tuberculose representa um flagelo para a saúde global. Segundo o último relatório anual da WHO, é classificada como a maior causa de morte por doença infectocontagiosa em todo o mundo, superando, inclusive, o vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* - HIV) [WHO, 2015].

Existe grande variação de como os diferentes integrantes do MTBC afetam as diversas espécies de hospedeiros suscetíveis (animais domésticos, silvestres e humanos). No entanto, existem também importantes interseções entre humanos e animais no que tange a epidemiologia da tuberculose. Neste contexto, o exemplo mais contundente é a ocorrência da infecção por *M. bovis* tanto nos humanos quanto nos animais (THOEN et al., 2014).

A tuberculose causada por *M. bovis* (bTB) é uma zoonose de distribuição mundial. Embora tenha ampla variedade de hospedeiros, afeta primariamente os bovinos, podendo ser transmitida aos humanos pelo consumo de leite e derivados sem processo de pasteurização ou outros tipos

de tratamento térmico, além da inalação de aerossóis infectantes, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, como as pessoas vivendo com HIV/AIDS (HLAVSA et al., 2008). A proporção mundial de casos de infecção por *M. bovis* é maior entre pacientes com tuberculose extrapulmonar, uma vez que o patógeno é frequentemente adquirido por ingestão oral. Nestes casos, as manifestações gastrointestinais são um indicativo clínico importante (O'REILLY e DABORN, 1995).

Nos países desenvolvidos, atualmente a bTB corresponde à cerca de 1 a 2% dos casos de tuberculose nos humanos (HLAVSA et al., 2008; MUELLER et al., 2013). O número anual de casos novos de bTB no Reino Unido, no período de 1990 a 2003, variou de 17 a 50, o que corresponde a 0,5 a 1,5% dos casos confirmados de tuberculose (DE LA RUA-DOMENECH, 2006) e, em 2007, a proporção manteve-se em 0,5% (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2008). A Escócia apresenta registros anuais de 15 casos de bTB (HUGHES, et al., 2003). Na Holanda, estimou-se 1,4% de bTB entre casos de tuberculose nos anos de 1993 a 2007 (MAJOOR et al., 2011). Na Espanha, foi referido que a bTB correspondeu à 0,95% dos casos de tuberculose entre 1980 e 2003 (ESTEBAN et al., 2005). Nos últimos anos a infecção tem sido pouco comum na Europa, que em 2013 registrou 134 casos em toda a União Europeia. A maioria dos casos foram registados na Irlanda, Alemanha, Reino Unido e Espanha (GARCÍA, 2015). Nos Estados Unidos, a proporção de bTB foi de 1,4% dos casos de tuberculose entre 1995 e 2005 (HLAVSA et al., 2008).

Em contraste, nos países em desenvolvimento, particularmente em regiões mais pobres da África, a bTB ainda apresenta alta prevalência e a pasteurização do leite ou as atividades de vigilância sanitária ao abate não são extensivamente praticadas. Nestas regiões, a situação epidemiológica da infecção é semelhante à encontrada no início do século XX, apontando que em média 10 a 20% dos casos de tuberculose humana sejam causados por *M. bovis* (MUELLER et al., 2013), podendo atingir proporções ainda maiores, como 40% em dados anuais (BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015).

Tradicionalmente, nestes países, o diagnóstico da tuberculose ainda é firmado de modo empírico, baseado apenas na avaliação clínico-radiográfica do paciente ou na baciloscopia de esputo (escarro). A deficiência de

instalações adequadas para o manejo laboratorial de micobactérias em condições de biossegurança limita ou impede o cultivo micobacteriano ou outros diagnósticos mais específicos (SINGH et al., 2007). Soma-se a essa limitação, o fato da maioria dos laboratórios nos países em desenvolvimento não realizarem cultura de micobactérias de maneira rotineira e um número restrito de laboratórios serem capacitados para identificação de *M. bovis*. Com efeito, acredita-se que o número de casos humanos de infecção por *M. bovis* seja subestimado (KANEENE et al., 2014; BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015).

Nesse contexto, a WHO alerta atualmente para a necessidade de ampliação do número e da capacidade dos laboratórios de diagnóstico para a tuberculose e micobacterioses em todo o mundo. Em 2010, oito dos 22 países com altos índices de tuberculose (incluindo o Brasil), que juntos correspondem a 80% dos casos de tuberculose em nível global, não atingiram a meta de um centro de microscopia para cada 100.000 habitantes. Combinando a lista destes 22 países com a relação de 27 países com maior número de casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB, resistentes à isoniazida e rifampicina), obtém-se 36 nações, das quais 20 não possuem a capacidade recomendada de um laboratório capacitado para cultivo micobacteriano, tampouco de testes de sensibilidade *in vitro* aos fármacos para cada 5 milhões de habitantes (WHO, 2011).

A descoberta dos antimicrobianos na década de 1940 revolucionou o tratamento de doenças infecciosas e, ao mesmo tempo, aventou-se a possibilidade de erradicar os agentes patogênicos bacterianos como uma das principais causas de morbidade e mortalidade. No entanto, nos 70 anos subsequentes a humanidade assistiu o surgimento de micro-organismos que são resistentes a quase todos os antimicrobianos postos em uso corriqueiro. Neste cenário, a tuberculose não foi uma exceção (KOCH et al., 2014).

Não obstante à grande disseminação da doença, novas preocupações têm surgido, como a propagação das linhagens MDR-TB, bem como extensivamente droga-resistentes (XDR-TB, resistentes à isoniazida, rifampicina, uma fluorquinolona e ao menos um fármaco injetável de segunda escolha, i. e., amicacina, capreomicina ou canamicina) e, ainda, as totalmente

droga-resistentes (TDR-TB, resistentes a todos os fármacos conhecidos) [GALAGAN, 2014].

De maneira geral, a resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça crescente para a saúde pública e a segurança mundiais. Novos mecanismos de resistência dos patógenos continuam a surgir e se disseminar, fato que limita o sucesso no tratamento adequado das principais doenças infecciosas de origem bacteriana. Atividades continuadas de vigilância que visam monitorar a emergência e propagação da resistência aos fármacos figuram como componente crucial da estratégia de luta contra a resistência antimicrobiana (WHO, 2014).

Especificamente na tuberculose, estima-se que 3,3% dos casos novos e 20% das recidivas sejam MDR-TB. Em 2014, estimou-se a incidência de 480.000 casos de MDR-TB em todo o mundo, 300.000 na forma pulmonar da infecção e cerca de 190.000 mortes por MDR-TB. Cerca de 9,7% dos pacientes com MDR-TB têm XDR-TB. Em todo o mundo, apenas 12% dos casos novos bacteriologicamente confirmados e 58% dos casos anteriormente tratados foram testados para a resistência às drogas em 2014, ainda assim, acima dos 8,5% dos casos novos e 17% dos recidivantes que foram testados em 2013 (WHO, 2015).

Ainda em 2014, 123.000 pacientes com MDR-TB ou tuberculose rifampicina-resistente (RR-TB) foram efetivamente notificados, equivalente a 41% dos 300.000 doentes que deveriam ter sido identificados como portadores de MDR-TB no universo de casos notificados naquele ano. O número de identificações foi quase o mesmo que em 2013. A grande lacuna de diagnóstico, portanto, persistiu. Dentre as 123.000 notificações, 111.000 pacientes iniciaram o tratamento específico para MDR-TB, um aumento de 14% em comparação a 2013 (WHO, 2015).

Embora escassos, estudos em outros países tem investigado a ocorrência de linhagens de *M. bovis* resistentes à isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) em bovinos ou reservatórios silvestres, além de casos humanos de tuberculose (SECHI et al., 2001; FITZGERALD et al., 2011; BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015). Até o momento, foram conduzidos somente dois estudos

no Brasil, Zanini (2002) e Parreiras (2003), que investigaram a resistência à INH e RMP em linhagens de *M. bovis* isoladas de bovinos brasileiros.

A vigilância da resistência aos fármacos fornece subsídios para a implementação de medidas terapêuticas mais eficazes na tuberculose zoonótica, para a otimização de políticas públicas e do uso de recursos financeiros nos sistemas de saúde e, conseqüentemente, para a diminuição do risco da transmissão entre humanos. Somada a esses aspectos, a investigação da diversidade genética dos isolados de *M. bovis* pode auxiliar na melhor compreensão da estrutura e dinâmica populacional do patógeno, bem como seus padrões de transmissão. Contribui, ainda, para o sucesso dos programas de controle e erradicação da bTB (DUARTE et al., 2008).

A análise de 26 genes estruturais em mais de 800 isolados do MTBC revelou nível extremamente restrito de variação de nucleotídeos homólogos (SREEVATSAN et al., 1997; WIRTH et al., 2008; DJELOUADJI et al., 2011). Portanto, a integração de ferramentas de genotipagem das linhagens do MTBC fomentou uma nova abordagem para entender a distribuição global da tuberculose e seus padrões de transmissão na população (DEMAY et al., 2012).

Em conjunto com investigações epidemiológicas clássicas, esses métodos de tipagem molecular constituem o novo padrão-ouro para otimizar a vigilância da tuberculose em nível nacional, regional e global por instituir metodologia de “genotipagem universal” de isolados clínicos (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008).

O presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genotípica de linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro na região centro-oeste do Estado de São Paulo, bem como determinar o perfil fenotípico de resistência destas linhagens à dois dos fármacos de primeira escolha no tratamento da tuberculose (INH e RMP) e investigar possíveis bases genéticas da resistência antimicrobiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em nível global, a tuberculose representa atualmente um dos principais problemas de saúde pública de origem infecciosa. Estima-se que em 2014 houve 9,6 milhões de novos casos de tuberculose, 0,6 milhão a mais do que em 2013 (12% dos casos novos entre pessoas HIV-positivas) e 1,5 milhão de mortes (1,1 milhão entre as HIV-negativas e 0,4 milhão entre as HIV-positivas). No total de mortes, 890.000 indivíduos eram homens, 480.000 mulheres, e 140.000 crianças. Essas perdas de vidas humanas são inaceitáveis, uma vez que com diagnóstico precoce e correto, associado ao tratamento adequado, quase todos os pacientes com tuberculose podem se curar (WHO, 2015).

Por muitos anos acreditou-se que a tuberculose tivesse evoluído dos bovinos para os humanos, concomitantemente à domesticação do gado, cerca de 10.000 anos atrás (UJVARI, 2008). Esta hipótese foi refutada mediante as técnicas de sequenciamento de DNA e genoma comparativo entre as espécies do MTBC (BROSCH et al., 2002).

A identificação de evidências moleculares de MTBC em múmias pré-Colombianas do Peru e Chile sugere a disseminação global do MTBC antes da domesticação de animais. Além disso, lesões típicas de tuberculose foram identificadas em bovídeos norte-americanos (125.000 a 8.000 anos atrás), mastodontes (38.000 a 10.000 anos atrás), e em fóssil de bisão (17.000 anos atrás), e a análise molecular revelou DNA mais alinhado às estirpes modernas de *M. tuberculosis* do que *M. africanum* e *M. bovis* (GALAGAN, 2014). Em paralelo, maior número de deleções genômicas (ou regiões de diferenciação) foi identificado no genoma de *M. bovis*, principalmente na linhagem clássica dos bovinos e nas linhagens BCG (bacilo de Calmette-Guérin), evidenciando surgimento mais tardio desta espécie entre as micobactérias (BROSCH et al., 2002).

Embora tenha origens pré-históricas, a elucidação da tuberculose zoonótica começou em 1810, quando Carmichael observou ligação entre as manifestações de escrófula (linfadenite cervical) e o consumo de leite bovino em crianças, embora, equivocadamente, tenha atribuído a causa das escrófulas à fatores nutricionais (GRANGE e YATES, 1994). Em 1843, Philipp

Klenke observou maior incidência de linfadenite cervical entre crianças alimentadas com leite bovino do que nas que ingeriam leite materno (FERREIRA NETO e BERNARDI, 1997).

Mesmo diante destas evidências, a importância zoonótica da tuberculose foi subestimada no passado. Robert Koch, após relatar em 1882 o primeiro isolamento do bacilo causador desta doença, manteve conceitos controversos sobre a infecção. Koch acreditava que o agente causal da tuberculose humana apresentava pouca patogenicidade para bovinos, tampouco o bacilo da tuberculose bovina seria patogênico para os humanos, chegando a defender esta teoria no Congresso Britânico de Tuberculose, em 1901 (DE LA RUA-DOMENECH, 2006). Essa hipótese foi largamente contestada por médicos veterinários, dentre os quais profissionais de renome, como Ravel, Sir John M'Fadyean e Bernard Bang (GRANGE e YATES, 1994).

Para resolver o debate, o governo britânico designou a *Royal Commission on Tuberculosis* para investigar o potencial zoonótico da doença. Essa comissão trabalhou de 1901 a 1911, dispondo de laboratório e fazenda experimental, onde desenvolveu extenso programa de pesquisa com o assunto (SALAZAR, 2005). O parecer final da comissão concluiu que a bactéria da tuberculose bovina não só infectava os humanos, como também desencadeava doença clínica. O leite bovino foi então identificado como potencial via de transmissão do bacilo para humanos (DE LA RUA-DOMENECH, 2006). Desde então, historicamente, *M. bovis* tem sido relatado em casos de tuberculose extrapulmonar, com maior frequência em crianças, principalmente devido à ingestão de leite não pasteurizado, ou não submetido a outros tipos de tratamento térmico (THOEN et al., 2006; REGASSA, 2008).

Embora a bTB seja muito antiga, e tenha sido estudada mais extensivamente no último século, muitos de seus aspectos ainda continuam objeto de controvérsia, a contar pela sua exata definição. Inicialmente a enfermidade foi definida, de maneira geral, como infecção causada por *M. bovis* (BEZOS et al., 2014), a qual será adotada no presente texto. No entanto, recentemente a União Europeia propôs a definição como infecção de bovídeos (todas as espécies do gênero *Bos* e *Bubalus bubalus*) e bisões (*Bison bison*) causada por espécies do MTBC (EUROPEAN COMMISSION, HEALTH &

CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2013). Até o momento, o agente etiológico mais comum da tuberculose em bovídeos é *M. bovis* e, de maneira mais rara, *M. caprae*, espécie que se restringe ao território europeu (MUELLER et al., 2013).

A importância da bTB reside principalmente nos países onde há poucas informações epidemiológicas sobre incidência e prevalência da infecção por *M. bovis* nos humanos (THOEN et al., 2014). Nesse contexto se enquadra o Brasil, onde a situação da bTB não é totalmente conhecida, pois praticamente não existem levantamentos epidemiológicos recentes que forneçam objetivamente a frequência da infecção por *M. bovis* na população humana (ABRAHÃO, 1998). Raros estudos nacionais com essa temática encontram-se publicados. Rocha et al. (2011) e Sobral et al. (2011) não encontraram cepas de *M. bovis* ao analisarem amostras de casos humanos de tuberculose. Em contrapartida, um estudo no estado de Minas Gerais, apontou 1,6% de ocorrência de *M. bovis* em isolamentos micobacterianos de pacientes com tuberculose (KANTOR et al., 2014). A inconsistência de notificação de casos humanos de bTB talvez se deva ao fato de poucos laboratórios com capacidade para isolamento de micobactérias utilizarem rotineiramente meios de cultura contendo piruvato de sódio, sabidamente um ingrediente facilitador da multiplicação *in vitro* de *M. bovis* (SOBRAL et al., 2011).

O fato é que existem pouquíssimos relatos de tuberculose humana causada por *M. bovis* no Brasil (SOBRAL et al., 2011). No entanto, a presença de *M. bovis* no leite cru, a principal via de transmissão da bTB aos humanos, já foi demonstrada por diversos autores na comunidade científica (GUINDI et al., 1980; HOLSINGER et al., 1997; KAZWALA et al., 1998; CLAEYS et al., 2013), incluindo o Brasil (PARDO et al., 2001; LEITE et al., 2003; FRANCO et al., 2013).

Em território nacional, a produção de leite bovino possui uma minoria de produtores especializados, com grande potencial produtivo, e uma vasta maioria de produtores com exploração tipo familiar, com pouca tecnificação, pequeno volume de leite produzido, comercialização deficiente e qualidade pouco controlada. A instabilidade do mercado de leite no Brasil força esses pequenos produtores a procurar alternativas para o comércio de sua produção,

o que inclui a venda, sem fiscalização sanitária, de leite cru ou “leite informal”, para indivíduos que tem o hábito de consumo desse tipo de produto (NERO et al., 2004). Apesar da proibição da comercialização de leite sem tratamento térmico no Brasil desde 1952 (BRASIL, 1952), estima-se que do total produzido no país, o produto comercializado informalmente corresponda a cerca de 30% (ZOCCAL, 2014).

Visto que há um consumo significativo de leite cru entre a população brasileira, os estudos que identificaram a presença de *M. bovis* em leite demonstraram que existe um risco potencial de infecção e desenvolvimento de doença para estes consumidores. Há, definitivamente, subnotificação da tuberculose zoonótica no país (SOBRAL et al., 2011). De maneira geral, as culturas para micobactérias são realizadas em laboratórios regionais e nacionais, apenas em casos especiais ou para pesquisas sobre resistência a medicamentos e apenas em meios sólidos contendo glicerol, um considerável inibidor da multiplicação *in vitro* de *M. bovis* (SOBRAL et al., 2011; KANEENE et al., 2014).

A determinação sistemática de quais casos de tuberculose são causados por *M. bovis* é uma etapa essencial na compreensão da epidemiologia da bTB, o que subsidiaria a implementação de medidas efetivas de controle e prevenção (HLAVSA et al., 2008). Maior número e abrangência de pesquisas científicas se faz necessário para elucidar a importância relativa de *M. bovis* na incidência da tuberculose nos humanos, especialmente nos países em desenvolvimento (THOEN et al., 2014). As abordagens unificadas das medicinas humana e veterinária para o combate às zoonoses (definição atualmente utilizada para descrever de maneira ampla o conceito de *One Health*) são imprescindíveis nesse contexto (KANEENE et al., 2014).

Segundo a WHO, a obtenção de dados sobre a importância zoonótica do *M. bovis*, principalmente nos países em desenvolvimento, é dificultada basicamente por duas razões: (1) deficiência de informações epidemiológicas da infecção em humanos e animais e (2) falta de recursos financeiros para os países obterem os dados da situação da doença (ABRAHÃO, 1998). Em adição, posto que a bTB possui padrões epidemiológicos distintos nestes

países, faz-se necessária a intensificação da vigilância epidemiológica da enfermidade (ABRAHÃO, 1998; HLASVA et al., 2008).

A bTB é clínica, radiográfica e patologicamente indistinguível da tuberculose causada por *M. tuberculosis* (BILAL et al., 2010). Para o diagnóstico diferencial é necessária a cultura e identificação do agente etiológico por laboratórios de referência (BRASIL, 2009).

A apresentação clínica da bTB depende da rota de infecção. A via oral, pela ingestão de leite sem processos de tratamento térmico, geralmente resulta em doença extrapulmonar, com o desenvolvimento de granulomas cervicais ou mesentéricos, considerada a apresentação mais comum em humanos. Já a infecção por via aerógena causa sinais pulmonares. A manifestação pulmonar é a mais comum nos bovinos e nos humanos sob o risco ocupacional da infecção, os quais são infectados principalmente pela inalação dos bacilos (BILAL et al., 2010).

As linhagens de *M. bovis* são naturalmente resistentes à pirazinamida (PZA). No entanto, a sensibilidade aos outros fármacos antimicobacterianos geralmente é similar à observada em *M. tuberculosis* (BILAL et al., 2010). Segundo a WHO, as recomendações específicas para o tratamento da bTB consistem em um regime terapêutico com INH e RMP por nove meses, seguido de terapia com etambutol (ETB) por dois meses (MAJOUR et al., 2011). Mas na prática, os pacientes são tratados com o protocolo padrão (BILAL et al., 2010).

No Brasil, o protocolo de tratamento recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde, preconiza o uso de quatro fármacos associados em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas dos quatro fármacos (INH, RMP, PZA e ETB) em um comprimido para a fase intensiva de tratamento (os dois primeiros meses), seguido do uso de comprimidos dois em um (INH e RMP) para a fase de continuação, nos quatro meses seguintes (MIYATA, 2010). Continuam disponíveis medicações em formulações individualizadas para utilização em protocolos especiais (BRASIL, 2009).

Os humanos apresentam-se como hospedeiros acidentais de *M. bovis* (BILAL et al., 2010). No entanto, a bTB nos humanos é tão grave quanto a

causada por *M. tuberculosis*, podendo, inclusive, ser mais letal (KANEENE et al., 2014). De fato, Majoor et al., 2011, reportaram mortalidade de 19,9% entre os pacientes com bTB frente à 4,4% de mortes entre os indivíduos acometidos por *M. tuberculosis* em uma série de casos de 1993 a 2007, na Holanda. Dados epidemiológicos de San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América (EUA), revelaram que pacientes com bTB possuem 2,55 mais chances de morte ao longo do tratamento do que os acometidos por *M. tuberculosis* (RODWELL et al., 2008). Estes mesmos autores identificaram, na mesma região, proporções muito maiores de bTB nos humanos do que em outros locais dos EUA, como 45% dos diagnósticos em crianças e 8% dos casos em adultos confirmados por cultivo microbiológico do agente. A maior mortalidade nos casos de bTB em humanos pode estar relacionada à disseminação miliar e ao acometimento do sistema nervoso central nos pacientes (MAJOOR et al., 2011).

De maneira mais rara, há ainda a possibilidade da co-infecção por *M. bovis* e *M. tuberculosis* nos pacientes, inclusa no conceito de infecções mistas (GARCÍA, 2015). No Brasil, Silva et al. (2013) reportaram 1,6% de co-infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* em casos de tuberculose em área urbana. Essas situações são particularmente importantes em caso de as cepas apresentarem perfis distintos de sensibilidade aos fármacos, o que compromete a eficácia da terapêutica antimicrobiana no paciente (GARCÍA, 2015).

Historicamente, a ocorrência da bTB em humanos tem sido estreitamente relacionada com a da tuberculose em bovinos na mesma região (KANEENE et al., 2014; BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015). A infecção por *M. bovis* deve ser considerada em todos os grupos de risco, principalmente em áreas rurais. Deve haver trabalho integrado entre clínicos e microbiologistas para o sucesso do tratamento, especialmente considerando-se a resistência natural do micro-organismo à PZA e a possível resistência crescente à INH (BILAL et al., 2010).

Em paralelo ao impacto da doença em saúde pública, a bTB apresenta alta relevância econômica no contexto da pecuária, pois afeta diretamente a produtividade dos animais e também influencia o comércio internacional de produtos de origem animal (RODRIGUEZ et al., 2004; MICHEL et al., 2010). Neste quesito, destacam-se as perdas econômicas em decorrência da perda

de produtividade e abate compulsório de animais infectados nos rebanhos acometidos (ACHA e SZYFRES, 2003).

No Brasil, a tuberculose bovina ainda representa um dos principais problemas de saúde animal, embora esteja distribuída em diferentes taxas ao longo do território brasileiro. Entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais indicavam prevalência média nacional de 1,3% (BRASIL, 2006; KANTOR et al., 2014). Em 2001 foi instituído o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com objetivo de diminuir a prevalência e o impacto negativo da tuberculose e da brucelose na saúde animal e pública (BRASIL, 2006). No ano de 2014, em estudo oficial realizado pela coordenadoria do PNCEBT, os dados revelaram que a prevalência de focos de bTB nos estados de Rondônia, Bahia, Mato Grosso, Paraná e São Paulo foi, respectivamente, 2,3%, 1%, 1,2%, 2,3% e 8,6%. Já o número de animais positivos nesses estados, no mesmo estudo, foi, respectivamente, 0,1%, 0,1%, 0,1%, 0,4% e 1,6% (PAES e FRANCO, 2016).

Em 2010, 1.192 focos e 4.003 casos de tuberculose bovina foram reportados no Brasil. Na linha de abate, as carcaças que apresentem lesões pequenas e circunscritas tem seus conjuntos de vísceras descartados, são submetidas à processamentos especiais, com tratamento térmico, e são destinadas à produção de carne em conserva ou enlatada. No entanto, essas peças não podem ser exportadas. Já as carcaças com lesões abertas ou generalizadas são totalmente condenadas e destruídas (KANTOR et al., 2014).

Segundo os últimos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil detém o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, superado somente pela Índia. Nacionalmente, o setor pecuário da bovinocultura representa um dos principais itens do agronegócio, é promissor, e ainda apresenta tendências de crescimento. Em 2014, o efetivo de bovinos era de 212,34 milhões de cabeças, representando um aumento de 0,3% em relação ao registrado em 2013 (BRASIL, 2014). Existem no país mais de 4.000 abatedouros, que juntos processam mais de 21 milhões de cabeças de gado para consumo no mercado interno e também para exportação (KANTOR et al., 2014). Assim, é imprescindível disponibilizar no mercado

produtos de origem animal de qualidade e baixo risco sanitário para consumidores internos e externos cada vez mais exigentes (BRASIL, 2006).

O presente momento representa um marco na história da tuberculose, pois se completam 20 anos da criação do sistema de monitoramento global da ocorrência da doença, bem como marca-se o prazo de alcance das metas estabelecidas no ano 2000 para o controle da enfermidade (chamadas *Millenium Development Goals*, estabelecidas pela WHO). Em adição, também é um momento de transição das estratégias globais de controle para as estratégias globais de erradicação completa da doença (denominadas *Sustainable Development Goals*, também estabelecidas pela WHO) que, de maneira geral, visam reduzir em 90% a mortalidade e em 80% o número de casos novos de tuberculose (em comparação aos índices de 2015) até 2030 (WHO, 2015).

No entanto, é preciso salientar que a tuberculose é uma enfermidade de caráter interespecífico quanto aos seus hospedeiros possuindo, portanto, diversos reservatórios animais, tanto domésticos quanto silvestres. Desta forma, uma abordagem visando a erradicação definitiva da doença deve reconhecer estes reservatórios e incorporar estratégias para incluir estes aspectos dentro de um programa global de enfrentamento (THOEN et al., 2014).

2.1 Diagnóstico laboratorial das micobactérias

A confirmação do diagnóstico clínico das infecções por micobactérias e a identificação laboratorial do micro-organismo envolve a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços, isolamento e identificação das espécies (OSOBA, 2004). As técnicas tradicionais de diferenciação das micobactérias consideram a velocidade de multiplicação, morfologia e pigmentação das colônias, associadas aos testes bioquímicos (YIM e HOLLAND, 2004).

As espécies de *Mycobacterium* são altamente exigentes em termos de nutrientes para o isolamento *in vitro* se comparadas com outras bactérias patogênicas (BALIAN et al., 2002). O isolamento de agentes do gênero *Mycobacterium* requer meios de cultivo ricos e específicos, alguns à base de

ovo, além de processos de descontaminação prévia dos espécimes, utilizando ácidos ou álcalis (QUINN et al., 2005). A temperatura ótima de multiplicação para a maioria das micobactérias de interesse humano e animal é de 35-37°C (BRASIL, 2005). O tempo necessário para a multiplicação dos micro-organismos do gênero *Mycobacterium* também é longo em comparação com outras bactérias, podendo atingir 60 a 90 dias em algumas espécies (PRIMM et al., 2004). Tal fato retarda o diagnóstico precoce com base em métodos fenotípicos.

Técnicas moleculares para o estudo das micobactérias tem sido desenvolvidas mais intensivamente nas duas últimas décadas, com objetivo de aumentar a precocidade e a fidelidade do diagnóstico, agilizar a instituição de tratamentos, diminuir o tempo de detecção da resistência aos antimicrobianos, possibilitar estudos dos padrões genotípicos dos isolados e otimizar a adoção de medidas apropriadas para o controle e profilaxia das infecções (OSOBA, 2004). A recomendação atual consiste no uso de uma combinação de ensaios fenotípicos e moleculares, particularmente para a identificação de *M. tuberculosis* (WASHINGTON et al., 2006).

Todas as espécies do MTBC são geneticamente muito semelhantes, possuindo 99,9% de homologia no genoma, com sequências idênticas no 16S rRNA, mesmo apresentando diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade (SREEVATSAN et al., 1997; BROSCHE et al., 2002; COUSINS et al., 2003). Kasai et al. (2000) estabeleceram a diferenciação molecular das espécies do MTBC a partir da análise do polimorfismo nos fragmentos de restrição do gene *gyrB*, que codifica a subunidade β da enzima DNA girase (topoisomerase II), envolvida nos processos de multiplicação bacteriana, e universalmente distribuída entre estes micro-organismos (CHIMARA et al., 2004). A técnica recebeu complementações propostas por Niemann et al. (2000).

Com relação aos métodos de genotipagem molecular, a base de todas as técnicas é a identificação de mutações genéticas estáveis que foram adquiridas ao longo do tempo, criando deste modo perfis únicos entre os isolados (DREWE e SMITH, 2014). Devido ao perfil de expansão altamente clonal do MTBC, a utilização de combinações de múltiplos marcadores

filogenéticos representa a melhor abordagem para a caracterização de linhagens (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008). A combinação de duas metodologias de tipagem molecular confere maior confiabilidade na análise dos perfis (RORING et al., 2002; SKUCE et al., 2002; SOLA et al., 2003). Em uma perspectiva de pesquisa, a identificação precisa e o estudo de clones específicos em nível mundial pode contribuir para o desenvolvimento de novos instrumentos de diagnóstico, profiláticos e terapêuticos para o controle da tuberculose, bom como avaliar a distribuição geográfica das linhagens do MTBC (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008).

A associação de métodos moleculares tem propiciado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do MTBC (ROCHA, 2009). O *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) é baseado na amplificação do *locus* DR (*Direct Repeat*) do MTBC, detectando por processo de hibridização de DNA, a presença ou ausência de sequências espaçadoras neste *locus* (KAMERBEEK et al., 1997). O método é simples e rápido, e adequado para inquéritos epidemiológicos em larga escala (KANDUMA et al., 2003). O grau de diferenciação e a reprodutibilidade da técnica de *Spoligotyping* são bons, embora possui menor poder discriminatório que o estudo do número variável de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas [*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing* (MIRU-VNTR)] (ROMERO et al., 2006).

As unidades micobacterianas repetitivas intercaladas (MIRUs) são elementos genômicos de 40-100pb encontrados como sequências repetidas e dispersas em regiões intergênicas do genoma do MTBC. A abordagem clássica envolve 12 MIRUs, e o painel completo atualmente conta com 24 MIRUs (SUPPLY et al., 2000, 2006). O MIRU-VNTR baseia-se na amplificação via PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) de múltiplos *loci* repetitivos usando iniciadores específicos para cada *locus*, e posterior determinação de tamanho dos amplicons, que refletem o número de cópias das MIRUs (SUPPLY et al., 2006).

A associação de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR tem sido utilizada para a tipificação de *M. bovis* na maioria dos laboratórios, por serem técnicas padronizadas, rápidas e de bom custo/benefício (ROMERO et al., 2006;

SUPPLY et al., 2006). O uso conjunto de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR consiste em uma abordagem adequada para estudar epidemiologia, filogenia e adaptabilidade do MTBC de acordo com cada genótipo (KANDUMA et al., 2003).

Para a vigilância epidemiológica da resistência aos antimicrobianos, um dos métodos analíticos usados para avaliar a atividade antimicobacteriana dos fármacos, é a microtécnica denominada de MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*), considerada de fácil execução, pois permite testar vários fármacos e diferentes concentrações em uma única microplaca (COLLINS e FRANZBLAU, 1997). Nessa técnica, são utilizadas microplacas de 96 poços e *M. tuberculosis* H₃₇Rv como cepa de referência. Considera-se como a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos, a concentração capaz de inibir 90% da população bacteriana *in vitro*, o que corresponde à menor concentração das drogas capaz de impedir a mudança de cor do reagente revelador (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU et al., 1998).

No método REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*) o revelador *alamar blue* é substituído pelo revelador resazurina, um indicador de óxido-redução de coloração azul em seu estado oxidado, que altera para a coloração rosa fluorescente (resorufina) quando no estado reduzido (PALOMINO et al. 2002). A interpretação dos resultados da técnica é realizada por inspeção visual e fluorimétrica das microplacas (COLLINS e FRANZBLAU, 1997).

Nos últimos anos, as bases moleculares da multirresistência aos fármacos em *M. tuberculosis* tem sido objeto crescente de estudo (SECHI et al., 2001). Mutações pontuais, deleções ou inserções nos genes *inhA*, *katG* e *ahpC* tem sido associadas à resistência à INH (CARDOSO et al., 2004; VALVATNE et al., 2009) e cerca de 95% das linhagens resistentes à RMP apresentam mutações pontuais localizadas entre os códons 507 e 533 do gene *rpoB*, mais comumente nos códons 516, 526 e 531 (VALVATNE et al., 2009).

O teste GenoType MTBDR_{plus} ver. 2.0 (Hain Lifescience, Nehren Tübingen, Alemanha) é um teste qualitativo *in vitro* para a identificação genética do MTBC e da resistência à INH e/ou RMP a partir de espécimes clínicos ou amostras cultivadas. Baseia-se na tecnologia de *line probe assay* (LPA), endossada desde 2008 pela WHO (WHO, 2015). O teste consiste em

uma amplificação multiplex com iniciadores biotinilados e uma hibridização reversa. Para detecção da resistência à INH é examinado o gene *katG* (que codifica a catalase-peroxidase) e a região promotora do gene *inhA* (que codifica a enoil-ACP-redutase). Já a resistência à RMP é facultada pela detecção das mutações mais significativas associadas ao gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase DNA dependente).

No entanto, os mecanismos de resistência às drogas são apenas parcialmente esclarecidos, e ainda não está totalmente elucidado se a atual compreensão das bases genéticas da resistência aos antimicrobianos em *M. tuberculosis* é suficientemente abrangente (ZHANG et al., 2013). Em adição, uma vez que os antimicrobianos têm como alvo funções celulares essenciais dos micro-organismos, pode-se esperar que a ocorrência de mutações de resistência nos genes codificadores destes alvos terá impactos sobre a patogênese da infecção, um conceito vagamente incluso no termo "custo adaptativo". Tal hipótese, por sua vez, suscita questões fundamentais sobre a capacidade de *M. tuberculosis* em abrigar múltiplas mutações de resistência, mantendo a capacidade de infectar, persistir e causar a doença em seu hospedeiro. O controle efetivo da tuberculose exige uma compreensão mais profunda do impacto da resistência às drogas na interação patógeno-hospedeiro e dos fatores biológicos subjacentes ao relativo sucesso de estirpes resistentes (KOCH et al., 2014).

Os dados em relação à resistência de origem genética aos fármacos em *M. bovis* ainda são muito limitados, principalmente as linhagens isoladas de animais. Visto que a tuberculose bovina configura um dos maiores problemas de origem infecciosa na criação de bovinos em todo o mundo, torna-se primordial o controle e prevenção da transmissão de MDR-*M. bovis* aos humanos (SECHI et al., 2001).

2.2 Fármacos utilizados no estudo

2.2.1 Isoniazida (INH)

A INH é o fármaco de primeira linha mais amplamente usado para o tratamento da tuberculose clínica e em infecções latentes desde a sua descoberta em 1952 (ZHANG e YEW, 2009). Possui ação bactericida nas

micobactérias de crescimento rápido (não tuberculosas, ambientais) e bacteriostática nas espécies de crescimento lento (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008). Entretanto, na forma latente (não replicante) ou sob condições anaeróbicas os bacilos são resistentes (ZHANG e YEW, 2009).

A INH é um pró-fármaco que necessita de processamento pela hemoproteína de atividade enzimática catalase-peroxidase (KatG - codificada pelo gene *katG*) para se tornar ativa. Na sua forma ativa, a INH inibe a InhA (enzima codificada pelo gene *inhA*), uma redutase carreadora de enoil-acil nicotinamida-adenina-dinucleotídeo específica (enoil-ACP-redutase NAD-específica) [*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008]. Neste processo, o radical acil-isonicotínico, derivado da ação da KatG, reage com o NAD para formar uma INH-NAD ativa (MIYATA, 2010).

A enzima InhA está envolvida na elongação de ácidos graxos, mais especificamente, na síntese dos ácidos graxos de cadeia longa (ácidos micólicos), essenciais na composição da parede celular das micobactérias (QUINN et al., 2005; WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005), e esse é alvo de atuação mais bem descrito da INH. No entanto, mecanismos de atuação em DNA, carboidratos, lipídeos e metabolismo do NAD também podem estar envolvidos (CARDOSO et al., 2004).

É importante salientar que quando a INH é administrada isoladamente aos pacientes no tratamento da tuberculose, a resistência ao fármaco tende a surgir. Isolados inicialmente suscetíveis tornam-se resistentes em mais de 70% dos casos por ocasião da monoterapia com INH em período de três meses (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005).

Isolados clínicos que apresentam resistência à INH, frequentemente perdem a função da enzima KatG em ativar o pró-fármaco, principalmente linhagens com altos níveis de resistência (CIM>5µg/mL). Linhagens com baixo nível de resistência (CIM<1µg/mL), na maioria das vezes, ainda possuem algum grau de atividade da KatG (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005; MIYAYA, 2010). O principal mecanismo de resistência à INH são as mutações ou deleções no gene *katG* (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008), responsáveis por 60 a 80% dos casos de resistência (MIYATA, 2010). A mutação mais frequentemente encontrada é localizada no códon 315:

AGC>ACC (Ser>Thr) [CARDOSO et al., 2004; *Global Alliance for TB Drug Development*, 2008].

As ocorrências de mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* são consideradas mecanismos compensatórios para a perda da atividade enzimática da KatG nas linhagens resistentes (SHERMAN et al., 1999). Embora estejam presente em frequência menor entre os isolados (MIYATA, 2010), estas mutações podem ser utilizadas como marcadores alternativos na detecção de resistência à INH (CARDOSO et al., 2004).

Mutações também podem ocorrer na região codificante ou na região promotora do gene *inhA*, causando super-expressão da InhA ou mutações em seu sítio ativo, diminuindo a afinidade desta enzima à INH-NAD ativa (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008). Em geral, essas mutações estão associadas a baixo nível de resistência para INH e são menos frequentes do que mutações em *katG*, correspondendo a 20 a 35% dos isolados de *M. tuberculosis* (CARDOSO et al., 2004; HAZBON et al., 2006). A ocorrência simultânea de mutações em *inhA* e *katG*, conferem altos níveis de resistência à INH aos isolados clínicos (MIYATA, 2010).

2.2.2 Rifampicina (RMP)

Junto a INH, a RMP é outro importante fármaco de primeira linha anti-tuberculose, incluso na terapia da enfermidade desde a década de 1980 (RODRIGUES et al., 2012), após a conclusão de ensaios clínicos iniciados em 1967 (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005). Possui ação bactericida para *M. tuberculosis* (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005), e ao contrário da maioria dos antimicrobianos que requerem crescimento ativo e metabolismo micobacteriano para exercer seus efeitos, a RMP está inclusa restrita categoria de fármacos (que também inclui moxifloxacino e bedaquilina) que mantém atividade contra as formas intracelulares, de baixa replicação e até latentes do bacilo (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005; RODRIGUES et al., 2012). No entanto, sua efetividade frente à forma não replicante do agente é reduzida (WALLACE Jr. e GRIFFITH, 2005).

A capacidade farmacológica de atuação contra formas latentes e de baixa replicação bacteriana é particularmente importante na tuberculose, onde

a diminuição da atividade metabólica e o estado de latência do agente infeccioso são considerados fatores chave para a persistência da infecção. De fato, o papel da RMP na eliminação de bacilos com baixa atividade metabólica é o principal fator na confiança contínua dos programas oficiais de controle da tuberculose no uso da RMP como fármaco de primeira linha, a despeito da emergência e disseminação de linhagens resistentes à este fármaco (RR-TB) [RODRIGUES et al., 2012; KOCH et al., 2014].

Os mecanismos de ação da RMP se baseiam na interferência na síntese de RNA bacteriano por meio de sua ligação à subunidade β da RNA polimerase DNA dependente (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008; MIYATA, 2010). A RNA polimerase DNA dependente é constituída por uma enzima *core* formada por multissubunidades $\alpha\beta\beta'\omega$ em associação com uma subunidade σ para iniciar especificamente a transcrição a partir do reconhecimento dos promotores (ZHANG e YEW, 2009; KOCH et al., 2014).

O sítio de ligação da RMP está localizando próximo ao canal de RNA/DNA da enzima, e a ligação do antimicrobiano bloqueia fisicamente o trânsito de síntese da cadeia de RNA tão logo dois ou três nucleotídeos tenham sido adicionados (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008). Uma vez que as etapas de alongação da transcrição estejam em curso completo, a RNA polimerase já não é mais vulnerável à inibição mediada pela RMP. Por esta razão, a atividade RMP é restrita a uma fase muito específica da transcrição. No entanto, o mecanismo preciso pelo qual a interferência transcricional mediada pela RMP conduz a morte celular ainda não é totalmente compreendido (KOCH et al., 2014). A RMP não inibe a RNA polimerase de mamíferos (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008).

Para *Escherichia coli*, a ação bactericida da RMP pode vir do desencadeamento de apoptose através da ativação do "módulo do gene suicida" *mazF*, cujo mesmo sistema foi identificado em *M. tuberculosis* (*Global Alliance for TB Drug Development*, 2008).

Quase todas as linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à RMP apresentam mutações no gene *rpoB* (TELENTI et al., 1993). Essas mutações resultam em mudanças conformacionais no sítio de ligação da RMP, que, conseqüentemente, geram menor afinidade desta subunidade ao fármaco, ou

seja, a resistência (MIYATA, 2010). A alta resistência à RMP (CIM>32µg/mL) é derivada de mutações que ocorrem geralmente na região mais comumente envolvida com a aquisição de resistência, denominada *hot spot*, do gene *rpoB* (TELENTI et al., 1997), encontradas em 95 a 96% dos isolados (TELENTI et al., 1997; VALVATNE et al., 2009).

Os primeiros estudos de resistência à RMP em *E. coli* agruparam as mutações conferindo resistência em três pequenas regiões na porção central do gene *rpoB*: *cluster* I (aminoácidos de 512 a 534), *cluster* II (aminoácidos de 563 a 574) e *cluster* III (aminoácido 687) (ZHANG e TELENTI, 2000; KOCH et al., 2014). Em *M. tuberculosis*, as mutações no *cluster* I, mais precisamente nos códons 516, 526 e 531, estão entre as mais frequentes nos isolados resistentes (VALVATNE et al., 2009; KOCH et al., 2014).

Considerando o impacto das infecções por micobactérias em humanos e animais e o reduzido número de estudos com isolamentos de *M. bovis* de linfonodos no país, tampouco da diversidade genotípica e do perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos de primeira escolha no tratamento da tuberculose humana, foi idealizado o presente estudo.

3. OBJETIVOS

1. Caracterizar por técnicas de cultivo microbiológico e biologia molecular, isolados de *Mycobacterium* sp. obtidos de linfonodos bovinos com lesões compatíveis com tuberculose bovina, abatidos em frigorífico na região centro-oeste do estado de São Paulo;
2. Conhecer a diversidade genética de *M. bovis* em casos de tuberculose bovina em rebanhos da região do estudo;
3. Determinar o perfil fenotípico de resistência, e o valor da CIM dos isolados de *M. bovis* frente aos antimicrobianos INH e RMP;
4. Investigar a presença de mutações gênicas para resistência à INH e RMP nos isolados de *M. bovis* com resistência fenotípica a estes fármacos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Foram colhidos, aleatoriamente, 100 linfonodos de bovinos que apresentavam lesões macroscópicas de linfadenite (granulomas, *caseum*, linfadenomegalia), em diferentes carcaças, inspecionadas durante a linha de abate em frigorífico fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), no município de Lençóis Paulista, SP.

O tamanho da amostragem foi determinado usando o método de estimativa de proporções com a precisão desejada (DOHOO et al., 2010), considerando uma prevalência de *Mycobacterium* sp. de 50% (PARREIRAS, 2003), associada a uma margem de erro aceitável de 10%, e nível $\alpha = 0.05$.

4.2 Obtenção das amostras

As amostras de linfonodos foram colhidas no momento da inspeção das carcaças na linha de abate, entre agosto de 2014 e maio de 2015. Foram provenientes de rebanhos bovinos de 26 municípios no estado de São Paulo e um no estado de Minas Gerais (figura 1), a saber: Adolfo, Araçatuba, Bofete, Buri, Conchas, Delfinópolis, Dourado, Espírito Santo do Turvo, Franca, Garça, Guareí, Itaberá, Itapetininga, Itararé, Itatiba, Itobi, Itupeva, Marília, Pereiras, Piedade, Piracaia, Piracicaba, Pirajuí, Sabino, Sales, Santa Cruz do Rio Pardo e Zacarias.

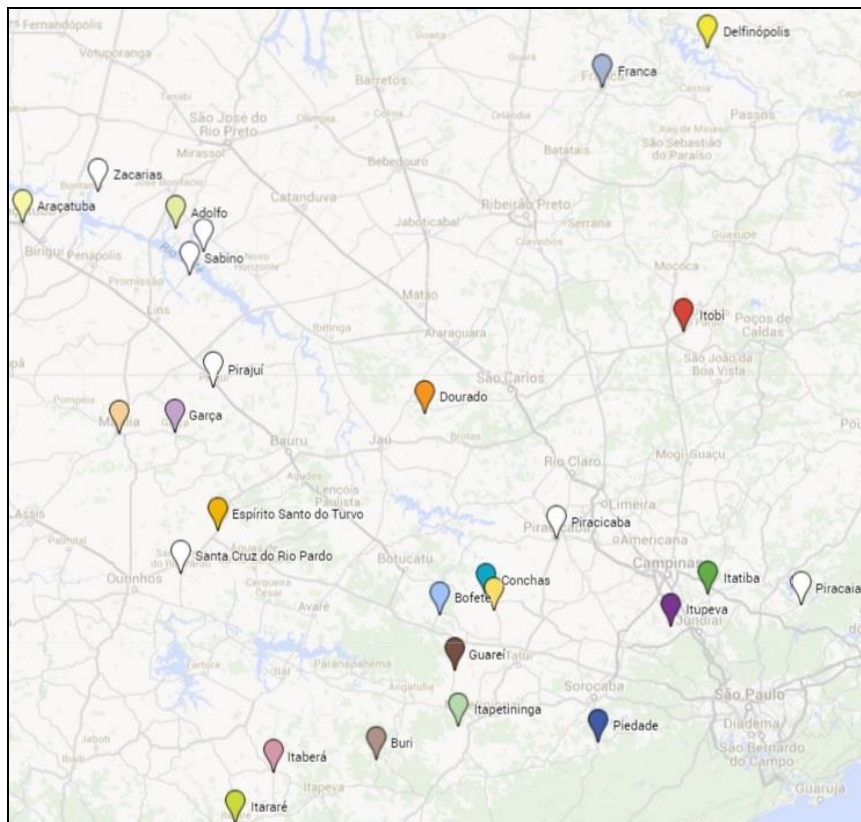


FIGURA 1. Mapa construído utilizando o *Google Maps*[®] indicando os diferentes municípios de origem das amostras de linfonodos colhidas em abatedouro para o diagnóstico da tuberculose. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

Após a identificação na linha de abate das lesões macroscópicas de linfadenite na inspeção externa ou na superfície de corte dos linfonodos, os espécimes foram acondicionados em sacos plásticos coletores estéreis tipo stomacher (Twirl'EM™ - Labplas, Ste-Julie, Canadá). Imediatamente após a colheita, os materiais foram transportados em recipientes isotérmicos contendo gelo reciclável (4 a 8°C) até a chegada ao Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu (FMVZ-UNESP/Botucatu), SP. As amostras permaneceram congeladas a -20°C até o momento do processamento.

4.3 Procedimentos laboratoriais

4.3.1 Descontaminação das amostras

Em câmara de fluxo laminar devidamente higienizada e esterilizada, cerca de um grama de cada amostra foi macerado com tesoura e pinça estéreis e disposto individualmente em tubos de centrifuga estéreis (volume de 15mL), para o processo de descontaminação pelo método de Petroff, empregando a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% (BALIAN et al., 2002). Para tanto, o material macerado foi acrescido de 5mL de solução de NaOH a 4% e 0,1mL da solução indicadora de pH azul de bromotimol a 0,02%. Após agitação a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Em seguida, foi adicionada a cada tubo solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4% até a mudança de cor do indicador do azul para o amarelo, e estabilização do pH entre 6,5 e 7,4. Os tubos foram centrifugados a 6.708g por 20 minutos. Desprezados os sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos com 5mL de solução salina estéril e homogeneizados com auxílio de agitador de tubos do tipo vórtex. As suspensões foram submetidas a outra centrifugação a 6.708g por 20 minutos. A etapa de lavagem dos sedimentos em solução salina estéril foi repetida por duas vezes. Novamente os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram utilizados no cultivo microbiológico.

4.3.2 Cultivo microbiológico das amostras

O sedimento gerado pelo processo de descontaminação de cada amostra foi inoculado em paralelo nos meios de cultura de Lowenstein-Jensen (BBL™ - Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e Stonebrink (preparação *in house*, segundo a WHO), solidificados em garrafas plásticas estéreis de cultivo celular (volume de 40mL) [Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça]. As garrafas devidamente fechadas permaneceram incubadas a 37°C em condições de aerobiose por período de 90 dias. As culturas foram inspecionadas semanalmente visando à detecção de multiplicação micobacteriana.

As colônias morfológicamente compatíveis com o gênero *Mycobacterium* foram analisadas em microscopia óptica utilizando a técnica tintorial de Ziehl-Neelsen, para a identificação de BAAR (QUINN et al., 2005).

4.3.3 Estoque dos micro-organismos

Os isolados classificados como BAAR foram estocados nos próprios meios de cultura, com realização de novas passagens condições supracitadas (conforme a necessidade), para obtenção de maior biomassa bacteriana.

O material genético de cada isolado também foi estocado sob congelamento (-20°C), após processo de extração de DNA por termólise (MAZARS et al., 2001). Para este processo, a quantidade de micobactérias equivalente ao preenchimento de uma alça bacteriológica descartável de 10µL foi adicionada em 350µL de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) em microtubos de centrífuga estéreis. Em seguida, foi aquecida a 100°C por 10 minutos e resfriada a -86°C por 10 minutos. O ciclo de aquecimento e congelamento foi repetido por três vezes. Os microtubos foram centrifugados à 13.201g sob refrigeração (4°C) por 20 minutos e o sobrenadante de cada microtubo foi então transferido para um novo microtubo estéril. O DNA extraído de cada isolado foi estocado a -20°C até o momento da realização das técnicas moleculares.

4.3.4 Identificação molecular dos micro-organismos

As etapas de identificação molecular foram realizadas no laboratório de micobacteriologia “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araraquara (FCFAR-UNESP/Araraquara), SP. Em todos os materiais genéticos foi realizada a amplificação do fragmento de 1020pb do gene *gyrB*, utilizando-se os iniciadores MTUBf (5'-TCGGACGCGTATGCGATATC-3') e MTUBr (5'-ACATACAGTTCCGACTTGCG-3') [CHIMARA et al., 2004]. O DNA foi submetido aos seguintes ciclos: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA), com marcador de peso molecular de 100pb (DNA Express, Guarulhos, SP, Brasil). Em seguida, 10 a 15µL do produto amplificado foram submetidos à digestão pelas enzimas de restrição *RsaI*, *TaqI* e *SacII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com GelRed™, com marcadores de peso molecular de 50pb e 100pb (DNA Express, Guarulhos, SP, Brasil). Após a eletroforese, os géis foram fotografados em equipamento de fotodocumentação Alpha Imager™ (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA). Os padrões encontrados foram comparados com os descritos por Chimara et al. (2004). Os isolados identificados como *M. bovis* foram submetidos à genotipagem e testes fenotípicos de resistência à INH e RMP.

4.3.5 Genotipagem das linhagens de *M. bovis*

4.3.5.1 Técnica de *Spoligotyping*

O DNA das linhagens isoladas de *M. bovis* foi submetido à técnica de *Spoligotyping* no laboratório de bacteriologia médica da Universidade Estadual de Maringá *campus* Maringá (UEM/Maringá), PR, com os iniciadores DRa (5'-GGTTTTGGGTCTGACGA-3', 5' *biotinylated*) e DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') [KAMERBEEK et al., 1997]. O DNA foi submetido aos seguintes ciclos: desnaturação a 96°C por 3 minutos, seguida de 20 ciclos de amplificação a 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos sob refrigeração (4 a 8°C) até o momento do uso.

Concomitantemente à realização da PCR foi preparada a membrana de hibridização Biodyne™ C Membrane (Pall Corporation, Port Washington, NY, EUA), seguindo o protocolo de Molhuizen et al. (1998). A membrana foi ativada (carregada com carga negativa) com 10mL de solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (EDAC) a 16% em garrafa específica para forno de hibridização (*rolling bottle*) em temperatura ambiente (25°C), dentro do próprio forno de hibridização (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), em

movimento, por 10 minutos. Em seguida, a solução EDAC foi descartada e a membrana lavada em água destilada por 2 minutos, ainda na garrafa.

A membrana foi posicionada sobre suporte de espuma *cushion* em *Miniblotter* com 45 canais (Immunelectrics, Boston, MA, EUA) devidamente fechado. Nos canais 1 e 45 foram aplicados 150µL de tinta Nankin diluída 1:100 em solução SSPE 2x (SSPE 1x = 0,18M NaCl, 10mM NaH₂PO₄ e 1nM EDTA [pH 7,7]). Nos 43 canais restantes foram aplicados os 43 oligonucleotídeos espaçadores sintetizados com grupamento amino na posição 5', cada um correspondendo a uma sequência espaçadora no *locus* DR (KAMERBEEK et al., 1997), um por canal, em ordem, evitando a formação de bolhas, diluídos em solução de NaHCO₃ pH 8,4 em concentrações previamente estabelecidas (tabela 1) [MOLHUIZEN et al., 1998].

TABELA 1. Sequência de sondas de DNA e concentrações de uso na técnica de *Spoligotyping* em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

Espaçador	Sequência de nucleotídeos	Concentração de uso (pMol/150µL)
1	[amino]5'-ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA-3'	[12,5]
2	[amino]5'-CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG-3'	[30,0]
3	[amino]5'-CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA-3'	[12,5]
4	[amino]5'-ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG-3'	[12,5]
5	[amino]5'-TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA-3'	[12,5]
6	[amino]5'-CGTCGTCAATTCGGGCTTCAATTC-3'	[12,5]
7	[amino]5'-GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC-3'	[25,0]
8	[amino]5'-CGTGAACCGCCCCAGCCTCGCCG-3'	[50,0]
9	[amino]5'-ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC-3'	[12,5]
10	[amino]5'-TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC-3'	[15,0]
11	[amino]5'-GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG-3'	[30,0]
12	[amino]5'-ATATCTGCTGCCCGCCGGGGAGAT-3'	[60,0]
13	[amino]5'-GACCATCATTGCCATTCCCTCTCC-3'	[12,5]
14	[amino]5'-GGTGTGATGCGGATGGTGGCTCGG-3'	[30,0]
15	[amino]5'-CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG-3'	[30,0]
16	[amino]5'-CGAGTTCGCTCAGCGTCGTAATC-3'	[12,5]
17	[amino]5'-GCGCCGGCCCGCGCGGATGACTCCG-3'	[100]
18	[amino]5'-CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG-3'	[12,5]
19	[amino]5'-TAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT-3'	[12,5]
20	[amino]5'-TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA-3'	[12,5]
21	[amino]5'-TCGATGTCGATGTCCAATCGTCGA-3'	[25,0]
22	[amino]5'-ACCGCAGACGGCAGATTGAGACAA-3'	[12,5]
23	[amino]5'-AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG-3'	[50,0]
24	[amino]5'-CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG-3'	[50,0]
25	[amino]5'-GATCAGCGACCACCGCACCCTGTCA-3'	[25,0]
26	[amino]5'-CTTCAGCACCATCATCCGGCGC-3'	[12,5]
27	[amino]5'-GGATTCGTGATCTTCCCGCGGAT-3'	[25,0]
28	[amino]5'-TGCCCGGGCGTTAGCGATCACAAC-3'	[12,5]
29	[amino]5'-AAATACAGGCTCCACGACACGACCA-3'	[12,5]
30	[amino]5'-GGTTGCCCGCGCCCTTTCCAGCC-3'	[12,5]
31	[amino]5'-TCAGACAGTTTCGCTCGATCAAGT-3'	[12,5]
32	[amino]5'-GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTC-3'	[25,0]
33	[amino]5'-GACATGACGCGGGTCCGCACTTGA-3'	[100]
34	[amino]5'-AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA-3'	[25,0]
35	[amino]5'-TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC-3'	[12,5]
36	[amino]5'-CGAAATCCAGCACACATCCGCGAGC-3'	[12,5]
37	[amino]5'-CGCGAACTCGTCCACAGTCCCGCTT-3'	[12,5]
38	[amino]5'-CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC-3'	[25,0]
39	[amino]5'-GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG-3'	[25,0]
40	[amino]5'-CGCCATCTGTGCCTCATACAGGTCC-3'	[12,5]
41	[amino]5'-GGAGCTTCCGGCTTCTATCAGGTA-3'	[12,5]
42	[amino]5'-ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC-3'	[25,0]
43	[amino]5'-CGCAGAATCGACCGGGTGGCGGAG-3'	[50,0]

A incubação do conjunto por 2 minutos à temperatura ambiente garante que os oligonucleotídeos (ou sondas de DNA), que possuem carga positiva, liguem-se covalentemente à membrana com carga negativa. Após o período de incubação, as soluções dos oligonucleotídeos foram aspiradas na ordem em que foram depositadas, com auxílio de bomba de vácuo. A membrana foi então retirada do *Miniblotter* e incubada em solução NaOH 100mM em vasilha plástica por, no máximo, 10 minutos a temperatura ambiente, sem agitação. Essa etapa é responsável pela inativação da membrana, sem prejuízo à imobilização das sondas de DNA. Em seguida, a membrana foi lavada em solução SSPE 2x suplementada com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) pré-aquecido a 60°C por 5 minutos, com leve agitação, em outra vasilha. Após essa etapa, a membrana foi novamente lavada, em uma nova vasilha, desta vez em solução de EDTA 20mM pH 8,0 em temperatura ambiente por 15 minutos, com leve agitação, e estocada em saco plástico hermeticamente fechado, sob refrigeração (4 a 8°C) até o momento do uso.

No momento da realização das hibridizações de DNA a membrana foi retirada do saco plástico e lavada em solução SSPE 2x com 0,1% SDS pré-aquecido a 60°C por 5 minutos, com leve agitação. Após a lavagem, foi posicionada no *Miniblotter* de modo que os canais do equipamento ficassem perpendiculares às linhas de aplicação das sondas de DNA, ou seja, as linhas marcadas com tinta Nankin foram posicionadas na direção dos orifícios superiores e inferiores dos canais. Os resíduos de líquido foram aspirados dos canais do *Miniblotter*.

Para a hibridização, 20µL dos produtos amplificados foram diluídos em 150µL de solução SSPE 2x com 0,1% SDS, desnaturados por calor a 100°C por 10 minutos em termociclador (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e imediatamente resfriados em gelo. As amostras diluídas foram aplicadas na membrana própria, perpendicularmente ao conjunto dos 43 oligonucleotídeos espaçadores, evitando a formação de bolhas. Os canais negativos receberam 150µL de solução SSPE 2x com 0,1% SDS, para que não ficassem vazios. Foram utilizados como controle positivo o DNA das cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5. A hibridização ocorreu por 60 minutos a 60°C, em posição horizontal e sem agitação (KAMERBEEK et al., 1997).

Após a hibridização, os canais do *Miniblotter* foram aspirados em ordem e a membrana passou por duas lavagens em 250mL solução SSPE 2x com 0,5% SDS a 60°C por 10 minutos. Em seguida foi cuidadosamente colocada na *rolling bottle*, aguardando o resfriamento. Foi então adicionado à membrana, 10mL de solução SSPE 2x SDS 0,5% com 3µL de estreptavidina conjugada com peroxidase (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) seguida da incubação da membrana a 42°C por 45 a 60 minutos no forno de hibridização em movimento, para reação enzimática com a biotina marcada nos produtos da PCR. Após esse período, duas novas lavagens foram realizadas em 250mL de solução SSPE 2x com 0,5% SDS pré-aquecida a 42°C por 10 minutos cada, e dois enxagues finais em 250mL de SSPE 2X a temperatura ambiente por 5 minutos.

A detecção do sinal de hibridização foi realizada por quimioluminescência, uma vez que a peroxidase presente no conjugado de estreptavidina catalisa a reação, resultando na emissão de luz que pode ser detectada por filme de raio-X (KAMERBEEK et al., 1997). Foi utilizado o *kit* comercial *Amersham ECL Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido), segundo as recomendações do fabricante. Nessa etapa, a membrana foi incubada em 20mL da mistura ECL por 1 minuto, e o excesso de líquido foi cuidadosamente retirado com papel toalha. A membrana foi embrulhada em plástico PVC e, em sala escura, foi colocada em cassete radiográfico exposta à filme de raio-X (Kodak, Rochester, NY, EUA) por 30 minutos.

A revelação do filme radiográfico foi realizada com o *kit* de reagentes reveladores e fixadores (Kodak, Rochester, NY, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O resultado da hibridização de cada linhagem foi confrontado com banco de dados genéticos internacional *online* SITVIT WEB (2012), para obtenção do *Spoligotyping International Type* (SIT) [DEMAY et al., 2012].

4.3.5.2 Técnica de MIRU-VNTR

Em paralelo à técnica de *Spoligotyping* foi conduzido o MIRU-VNTR dos isolados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo *campus* São Paulo (FMVZ-USP/São Paulo), SP, amplificando 12 MIRUs (*loci* 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40), de acordo com o protocolo de Supply et al. (2006). Para cada *locus* amplificado foi utilizado um par de iniciadores e uma reação de PCR (Tabela 2).

TABELA 2. Sequência de iniciadores utilizados na amplificação dos *loci* na técnica de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing* (MIRU-VNTR) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

Locus	Sequência de nucleotídeos
MIRU 2	5'-TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3' 5'-TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT-3'
MIRU 4	5'-GCGCGAGAGCCCGAACTGC-3' 5'-GCGCAGCAGAAACGTCAGC-3'
MIRU 10	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3' 5'-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT-3'
MIRU 16	5'-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3' 5'-CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC-3'
MIRU 20	5'-TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG-3' 5'-GGAGACCGCGACCAGTACTTGTA-3'
MIRU 23	5'-CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG-3' 5'-AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTG-3'
MIRU 24	5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3' 5'-GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA-3'
MIRU 26	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'-CATAGGCGACCAGGCGAATAG-3'
MIRU 27	5'-TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA-3' 5'-GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA-3'
MIRU 31	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3' 5'-GTGCCGACGTGGTCTTGAT-3'
MIRU 39	5'-CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC-3' 5'-CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT-3'
MIRU 40	5'-GGGTTGCTGGATGACAACGTGT-3' 5'-GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA-3'

Foi empregado um único protocolo de ciclagem para as reações de PCR: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5minuto, e 72°C por 10 minutos para alongação final. O produto de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com GelRed™, com marcadores de peso molecular de 100pb. Os géis foram fotografados em equipamento de fotodocumentação InGenius3™ (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Os tamanhos dos fragmentos encontrados foram avaliados com auxílio da tabela de conversão de fragmentos em alelos (SUPPLY et al., 2006). Os dados foram inseridos no SITVIT WEB (2012) para obtenção do MIRU *International Type* (MIT) correspondente (DEMAY et al., 2012).

4.3.6 Testes fenotípicos de resistência à INH e RMP nas linhagens de *M. bovis*

A determinação do perfil fenotípico de resistência à INH e RMP nas linhagens isoladas de *M. bovis* foi realizada no laboratório de Micobacteriologia “Prof. Dr. Hugo David” da FCFAR-UNESP/Araraquara, pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA), segundo o protocolo de Palomino et al. (2002). Na realização da técnica de REMA, foram utilizadas microplacas de 96 poços e *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 como cepa de referência.

Foi considerada como CIM dos agentes antimicrobianos, a concentração capaz de inibir 90% da população bacteriana *in vitro* (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU et al., 1998), o que corresponde à menor concentração dos fármacos capaz de impedir a mudança de cor (reação de redução) do reagente revelador de azul (resazurina) para rosa (resorufina). A classificação qualitativa dos isolados como “sensível” ou “resistente” foi baseada nos pontos de corte estabelecidos no método BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacterial Detection System* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA), considerado como padrão-ouro, de 0,1 µg/mL para INH e 1,0 µg/mL RMP. Esses valores, por sua vez, foram preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [CLSI, 2011].

Os antimicrobianos utilizados foram preparados individualmente em solução de estoque a 10mg/mL, aquosa para INH (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e em dimetil-sufóxido (DMSO) [Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA] para RMP (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e esterilizadas por filtração em película de 0,22µm (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). As soluções permaneceram congeladas a -20°C até o momento do uso. A resazurina sódica em pó (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi diluída em solução a 0,01% em água destilada e esterilizada por filtração em película de 0,22µm.

Para a realização das provas de REMA, cada solução de estoque dos antimicrobianos foi diluída 1:100 (dando origem às soluções de uso a 100µg/mL) em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado em 10% do volume com uma mistura de ácido oleico, albumina,

dextrose e catalase (OADC) [Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA].

Suspensões bacterianas foram concomitantemente preparadas, com cada uma das linhagens isoladas de *M. bovis* bem como de *M. tuberculosis* cepa H₃₇Rv ATCC 27294. A quantidade de micobactérias equivalente ao preenchimento de uma alça bacteriológica foi depositada em tubo de ensaio estéril, contendo 5mL de Middlebrook 7H9 acrescido de 10µL de Tween 80. As suspensões foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex e a turbidez ajustada para o tubo 1 da escala McFarland [1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /mL]. Após o ajuste, 500 microlitros das suspensões foram diluídas em 9,5mL (diluição 1:20) de Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC.

Na microplaca, os poços correspondentes às colunas 1 e 12 receberam 200µL de Middlebrook 7H9 com OADC estéril, a fim de evitar a desidratação do meio de cultura durante o período de incubação em estufa bacteriológica e servir como controle de esterilidade na prova (controle negativo). A coluna 11 recebeu apenas 100µL de Middlebrook 7H9, para posteriormente servir como controle positivo da prova. Nas colunas 2 a 10 foram aplicadas as diluições seriadas dos fármacos INH e RMP (Tabela 3) em volume total de 100µL do meio de cultura Middlebrook 7H9 com OADC, de maneira automatizada, pelo equipamento Precision™ XS (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

TABELA 3. Concentrações finais de diluição (expressas em µg/mL) em meio Middlebrook 7H9 dos fármacos utilizados na técnica de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

Colunas	INH	RMP
2	25,00	25,00
3	12,50	12,50
4	6,25	6,25
5	3,12	3,12
6	1,56	1,56
7	0,78	0,78
8	0,39	0,39
9	0,19	0,19
10	0,09	0,09

No primeiro e no último poço das colunas 2 a 10 foi adicionado apenas o Middlebrook 7H9 e o fármaco, servindo como controle de esterilidade (controle negativo). Nos poços correspondentes às linhas B a G das colunas 2 a 11, foi

inoculado o volume de 100µL das suspensões bacterianas diluídas, compondo o total de 6 linhas, 3 com a sequência de INH e três com RMP, para cada isolado testado (figura 2).

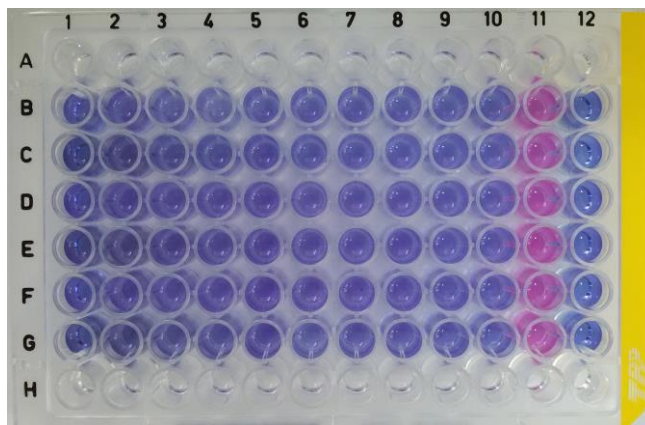


FIGURA 2. Microplaca de 96 poços utilizada na técnica de *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

As colunas 1 e 12 apresentam os controles negativos, a coluna 11 o controle positivo e as colunas 2 a 10 as diluições seriadas de INH e RMP. As linhas B, D, e F foram utilizadas para INH e as linhas C, E e G para RMP.

As microplacas tampadas foram seladas com Brand™ Parafilm™ M (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e incubadas a 37°C em atmosfera suplementada com 5% de CO₂. Após sete dias de incubação foi adicionado o volume de 30µL da resazurina diluída (0,01%) em água estéril nos poços das linhas B a G da microplaca. Após a reincubação a 37°C por mais 24 horas, foi realizada a leitura baseada na interpretação da fluorescência no leitor de microplacas Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA), utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590nm, respectivamente.

4.3.7 Pesquisa de mutações nos genes de resistência à INH e RMP nas linhagens de *M. bovis*

A pesquisa de mutações nos genes de resistência à INH e RMP foi realizada no DNA das 21 linhagens de *M. bovis* que apresentaram resistência fenotípica à INH e/ou RMP pela técnica de REMA. Esta etapa foi conduzida no laboratório de bacteriologia médica da UEM/Maringá. Foi utilizado o kit comercial GenoType MTBDRplus versão 2.0 (Hain Lifescience, Nehren Tübingen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a amplificação dos *loci* gênicos de interesse foi utilizada a mistura de reagentes para PCR do *kit* (AM-A e AM-B, 10 μ L e 35 μ L, respectivamente) com 5 μ L da suspensão de DNA de cada isolado. O DNA foi submetido aos seguintes ciclos: desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguida de 10 ciclos de amplificação a 95°C por 30 segundos, 65°C por 2 minutos e mais 20 ciclos a 95°C por 25 segundos, 50°C por 40 segundos, 70°C por 40 segundos, e extensão final a 70°C por 8 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos sob refrigeração (4 a 8°C) até o momento do uso.

Foram dispensados 20 μ L da solução de desnaturação (DEN) em uma das extremidades de cada uma das canaletas utilizadas do *kit*. Sobre a DEN adicionou-se 20 μ L da amostra amplificada, homogeneizando-se com cuidado, e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em cada canaleta foi adicionado 1mL da solução tampão de hibridização (HYB) pré-aquecida a 45°C, homogeneizando-se com o produto desnaturado da PCR. Uma tira de hibridização com o lado revestido pelas sondas virado para cima foi colocada em cada canaleta, e o conjunto incubado a 45°C por 30 minutos, com leve agitação. Após a aspiração completa da solução de hibridização, foi adicionado 1mL da solução de lavagem adstringente (STR) sobre cada tira e o conjunto incubado a 45°C por 15 minutos, com leve agitação.

A solução STR foi completamente removida e cada tira foi então lavada com 1mL da solução de enxague (RIN) a temperatura ambiente por 1 minuto, com leve agitação. Em seguida, foi adicionado 1mL do conjugado streptavidina-fosfatase alcalina diluído 1:100 na solução indicada (CON-C + CON-D) em cada canaleta, seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, com leve agitação. O composto conjugado foi totalmente removido e cada tira lavada por duas vezes com 1mL da RIN por 1 minuto, e uma vez com água destilada (por 1 minuto), a temperatura ambiente, com leve agitação.

Na etapa final, a água destilada foi removida, aspirando quaisquer vestígios de líquido. Em seguida, 1mL do substrato corante diluído 1:100 no diluente próprio (SUB-C + SUB-D) foi depositado em cada canaleta. O recipiente com as canaletas foi incubado em sala escura até que as bandas de hibridização estivessem claramente visíveis (cerca de 3 minutos), e a reação de revelação foi então imediatamente interrompida com duas lavagens com

água destilada nas tiras de hibridização. As mesmas foram secas sobre papel absorvente, fixadas na ficha de avaliação fornecida pelo *kit*, e avaliadas segundo os padrões fornecidos pelo fabricante, num total de 27 zonas de reação (figura 3).

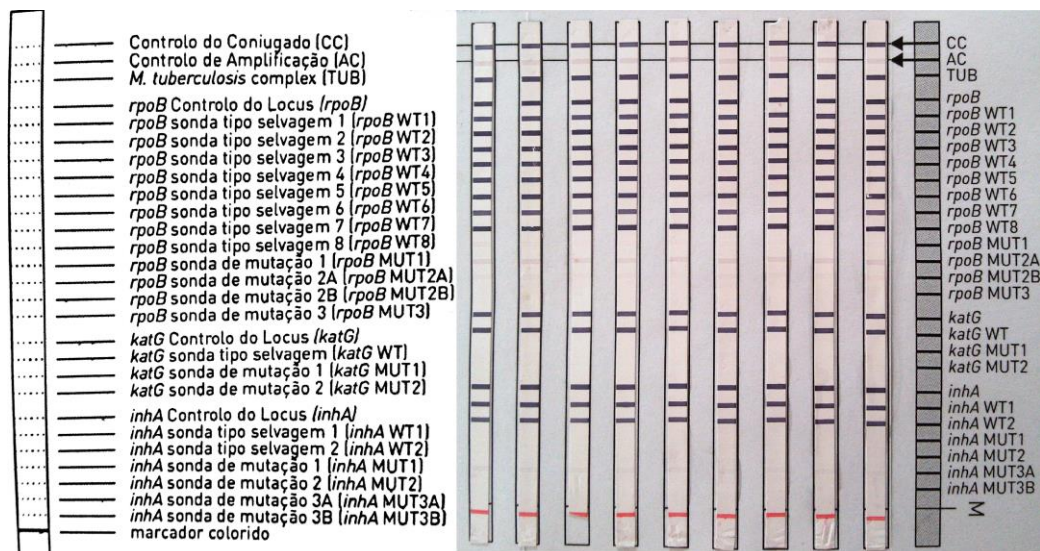


FIGURA 3. Representação esquemática (esquerda) e resultados de hibridização do *kit* GenoType MTBDRplus versão 2.0 em linhagens de *M. bovis* isoladas de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

5. RESULTADOS

Dentre os 100 linfonodos de bovinos de abatedouro com lesão caseosa amostrados, foram obtidos 67 isolamentos compatíveis com *Mycobacterium* sp. Pela análise da restrição enzimática do gene *gyrB*, todos os isolados foram classificados como *M. bovis* e, portanto, foram submetidos às técnicas de REMA, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR.

As provas de *Spoligotyping* revelaram 16 spoligotipos presentes entre as linhagens dos quais 14 foram classificados em SIT conhecidos (correspondentes à 63 isolados) e 2 perfis sem SIT, ou “órfãos” (correspondentes à 4 isolados), conforme os dados expressos na tabela 4. A subfamília BOV_1 predominou com 52 (77,6%) dos 67 isolados. A subfamília BOV_2 foi representada por 8 (11,9%) isolados e 5 (7,4%) isolados foram incluídos na família BOV, sem agrupamento em subfamília. Dois isolados “órfãos” pertenceram a um perfil não registrado no banco de dados SITVIT WEB, por conseguinte, não foram classificados em família ou subfamília.

Na subfamília BOV_1, foram identificados os SIT 481, 482, 594, 665, 691, 698, 1021, 1667, 1852, 2141 e dois isolados sem *shared type*. A subfamília BOV_2 foi a segunda mais frequente, com o SIT 683. Já os SITs 982, 1851 e 1853 foram agrupados na família BOV.

A análise de MIRU-VNTR com painel de 12 MIRUs, identificou 31 isolados pertencentes ao MIT 49, um isolado pertencente ao MIT 5 e 35 isolados considerados “órfãos”, ou sem MIT conhecido (tabela 4).

A junção das análises de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR possibilitou o agrupamento dos isolados em 12 *clusters* (contendo, ao todo, 46 isolados), definidos como o conjunto de dois ou mais isolados com perfis genotípicos idênticos, e 21 isolados diferenciados em perfis únicos.

A técnica de REMA revelou 21 isolados (31% do total) com resistência fenotípica aos fármacos testados. Dentre os 21 isolados, 11 (16%) foram classificados como MDR-TB. Outros 8 (12%) isolados apresentaram resistência à INH e 2 (3%) isolados foram resistentes à RMP. Os valores da CIM e a classificação qualitativa do perfil de sensibilidade *in vitro* aos fármacos envolvidos no estudo encontram-se expressos na tabela 5.

TABELA 5. Classificação qualitativa (com respectivos pontos de corte) e concentrações inibitórias mínimas (CIM, expressas em $\mu\text{g/mL}$) da sensibilidade à isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) obtidas pela técnica de *Rezasurin Microtiter Assay Plate* (REMA), em isolados de *M. bovis* obtidos de linfonodos de bovinos de abatedouro. Botucatu, SP, 2014 a 2015.

Ref.	Classificação		CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Ref.	Classificação		CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	(0.1 $\mu\text{g/mL}$) INH	(1.0 $\mu\text{g/mL}$) RMP	INH	RMP		(0.1 $\mu\text{g/mL}$) INH	(1.0 $\mu\text{g/mL}$) RMP	INH	RMP
4	S	S	< 0,098	< 0,098	52	S	S	< 0,098	< 0,098
5	S	S	< 0,098	< 0,098	53	S	S	< 0,098	< 0,098
6	R	S	>25	0,156	55	S	S	< 0,098	< 0,098
7	S	S	< 0,098	< 0,098	56	S	S	< 0,098	< 0,098
8	R	S	0,246	< 0,098	57	S	S	< 0,098	< 0,098
9	R	S	0,850	< 0,098	59	S	S	< 0,098	< 0,098
10	R	S	0,420	< 0,098	60	S	S	< 0,098	< 0,098
11	R	S	>25	< 0,098	62	S	S	< 0,098	0,171
12	R	R	>25	3,125	63	R	S	0,194	< 0,098
13	S	S	< 0,098	< 0,098	64	S	S	< 0,098	< 0,098
14	S	S	< 0,098	0,185	66	S	S	< 0,098	0,117
15	S	S	< 0,098	0,354	67	R	S	0,156	< 0,098
16	S	S	< 0,098	0,413	69	S	S	< 0,098	< 0,098
17	R	R	0,296	1,219	72	S	S	< 0,098	< 0,098
18	S	S	< 0,098	0,702	73	R	R	6,25	>25
19	S	S	< 0,098	< 0,098	74	S	S	< 0,098	0,164
20	S	S	< 0,098	< 0,098	76	S	S	< 0,098	< 0,098
21	S	S	< 0,098	0,562	77	R	R	>25	3,125
22	S	S	< 0,098	< 0,098	78	S	S	< 0,098	< 0,098
23	S	S	< 0,098	< 0,098	79	R	R	>25	3,125
24	S	S	< 0,098	< 0,098	81	S	S	< 0,098	< 0,098
25	R	R	0,203	1,389	82	R	R	>25	3,125
26	S	S	< 0,098	< 0,098	83	S	S	< 0,098	< 0,098
27	S	S	< 0,098	< 0,098	84	S	S	< 0,098	< 0,098
28	R	R	>25	5,624	85	R	S	0,120	0,099
29	S	R	< 0,098	1,259	86	S	S	< 0,098	< 0,098
30	S	S	< 0,098	< 0,098	88	S	S	< 0,098	< 0,098
31	S	S	< 0,098	< 0,098	90	S	R	< 0,098	2,759
39	S	S	< 0,098	< 0,098	91	R	R	>25	5,771
41	R	R	>25	3,125	93	S	S	< 0,098	< 0,098
42	S	S	< 0,098	< 0,098	96	S	S	< 0,098	0,727
45	S	S	< 0,098	0,141	97	S	S	< 0,098	< 0,098
48	S	S	< 0,098	0,150					
50	S	S	< 0,098	0,419					
51	R	R	>25	3,125					

Ref.= número de referência
 INH= isoniazida
 RMP= rifampicina
 CIM= Concentração Inibitória Mínima
 S= sensível
 R= resistente

A pesquisa por mutações gênicas relacionadas à resistência aos fármacos testados por meio do *kit* GenoType MTBDR*plus* versão 2.0 não acusou a presença de mutações (dentre as englobadas no *kit*) em nenhum dos isolados fenotipicamente resistentes.

6. DISCUSSÃO

Dados recentes sugerem que o surgimento da resistência aos fármacos e o perfil de transmissibilidade das micobactérias, são fortemente influenciados pelo cenário genético e evolutivo do MTBC (DJELOUADJI et al., 2011). Compreender os mecanismos da resistência micobacteriana aos fármacos é fundamental para desenvolver testes mais rápidos de diagnóstico molecular, e para delinear novas drogas antimicobacterianas, bem como auxiliar a implementação de medidas para prevenir o desenvolvimento de resistência nas linhagens (MIYATA, 2010).

Dentre os 67 isolamentos de *M. bovis* de bovinos de abatedouro, 21 isolados (31%) apresentaram algum padrão de resistência aos fármacos testados. Destes, 11(16%) foram classificados como MDR-TB, 8 (12%) apresentaram resistência à INH e 2 (3%) foram resistentes à RMP. Esses dados contrastam com os obtidos por Fitzgerald et al. (2011) em linhagens de *M. bovis* isoladas de veados silvestres abatidos em temporada de caça no estado americano de Michigan, que pesquisaram resistência à múltiplos fármacos pelos métodos de proporções e Bactec™ nas linhagens obtidas, não observando resistência. Esses cervídeos são considerados como os reservatórios primários da tuberculose para os bovinos domésticos na região onde foi conduzido o estudo (FITZGERALD et al., 2011). No entanto, na Itália, Sechi et al. (2001) reportaram 22,7% de multirresistência, bem como de resistência à RMP, e 18,9% de resistência à INH em estirpes de *M. bovis* isoladas de rebanhos bovinos.

No Brasil, Corrêa e Corrêa, em 1974, ao analisarem 200 amostras de casos de tuberculose humana já reportavam dados de resistência em 7 (3,5%) linhagens de *M. bovis*, sendo 3 multirresistentes. Parreiras (2003) não encontrou resistência fenotípica à INH e RMP em linhagens de *M. bovis* isoladas de lesões caseosas em bovinos, mediante avaliação qualitativa em meios de cultura sólidos com concentrações pré-estabelecidas dos antimicrobianos. Já Zanini (2002), reportou 2,4% de resistência à INH em isolados de *M. bovis* oriundos de lesões tuberculosas de bovinos.

No presente estudo, a identificação de mono e multirresistência nas linhagens de *M. bovis* isoladas de bovinos aos fármacos de eleição no tratamento da tuberculose em humanos representa uma preocupação em saúde pública, e estabelece estado de alerta para a vigilância epidemiológica da tuberculose bovina em território nacional. Ressalta-se ainda que a instituição do PNCEBT em 2001 pelo MAPA proíbe o tratamento dos bovinos infectados (BRASIL, 2006).

A resistência natural aos fármacos presente nas espécies do MTBC representa um entrave ao tratamento e controle da tuberculose. Essa resistência é atribuída à constituição peculiar da parede celular destes microorganismos, e ao sistema ativo de efluxo multidroga (DE ROSSI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012). Em paralelo, estudos têm revelado a existência de outros sistemas que neutralizam a ação dos fármacos, bem como a aquisição de mutações cromossomais, que por sua vez fornecem altos níveis de resistência das micobactérias aos antimicrobianos (RAMÓN-GARCÍA et al., 2009).

Embora influenciada por múltiplos fatores, a resistência do gênero *Mycobacterium* aos antimicrobianos é frequentemente associada a mutações em genes codificantes ou relacionados aos alvos celulares destes medicamentos (KOCH et al., 2014). No presente estudo, a pesquisa de mutações gênicas visou a triagem nas áreas mais comumente envolvidas com a aquisição de resistência para INH e RMP, ou *hot spots*, dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, mediante o uso de sondas de DNA para sequências tipo selvagem (*wild types*) e para mutações que medeiam a resistência antimicrobiana mais frequentemente encontradas em *M. tuberculosis*. Nenhuma das 21 estirpes testadas apresentou as mutações abrangidas pelo *kit* comercial MTBDR*plus* versão 2.0.

De fato, as mutações cromossomais não elucidam todos os casos de resistência, particularmente à INH, onde 20 a 30% dos isolados clínicos INH-resistentes não apresentam mutações em nenhum dos genes conhecidamente envolvidos (RODRIGUES et al., 2012). No entanto, para a RMP a ocorrência de mutações tem sido mais frequentemente associada à resistência, especialmente na zona *hot spot* do gene *rpoB*. Todavia, raros casos,

correspondentes à 2 a 4% dos isolados clínicos, não apresentam essas mutações (TELENTI et al., 1997).

Estudos recentes têm descoberto também novos genes e/ou regiões intergênicas associadas à resistência antimicrobiana nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, com a identificação de diversas localizações de polimorfismos de um único nucleotídeo em comparação com o genoma da cepa padrão H37Rv. Zhang et al. (2013) reportaram a identificação de 14 novos genes fortemente associados à resistência aos fármacos ao analisarem uma coleção de estirpes MDR- e XDR-*M. tuberculosis* na China. No mesmo estudo, os autores apontaram um painel de 84 genes possivelmente correlacionados com a resistência antimicrobiana. Ainda neste experimento, as conclusões ressaltaram a importância de futuros estudos sobre esses genes.

Diante da emergência da multirresistência das micobactérias, são imprescindíveis abordagens semelhantes englobando o genoma de linhagens clínicas de *M. bovis* droga-resistentes em comparação com o genoma padrão da linhagem BCG, visando elucidar se existem diferenças nas regiões de mutação em *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Essas possíveis diferenças poderiam justificar, em parte, a ausência da identificação de mutações para a resistência nos isolados de *M. bovis* obtidos de bovinos no presente estudo.

A aplicação das técnicas de genotipagem tem desvendado a estrutura da população clonal de MTBC, que compreende linhagens filogenéticas distintas caracterizadas por diferenças em suas distribuições geográficas, imunogenicidade, virulência e associações com a multirresistência aos antimicrobianos (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008). Entre os vários métodos de genotipagem para estudar o polimorfismo genotípico dos agentes do MTBC, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR ganharam recentemente a aprovação internacional como métodos robustos, rápidos e de alta reprodutibilidade, capazes de gerar dados em um formato passível de portabilidade entre laboratórios e pesquisadores (DEMAY et al., 2012).

A técnica de MIRU-VNTR com painel de 12 MIRUs, identificou um cluster de 31 isolados pertencentes ao MIT 49, um isolado pertencente ao MIT 5 e 35 isolados considerados “órfãos”, ou sem MIT conhecido. Estes dados estão em conformidade com os descritos por Demay et al. (2012) na instituição

da maior e mais completa base de dados internacional para o estudo da diversidade genética e epidemiologia molecular do MTBC atualmente disponível, o SITVIT WEB. No referido banco de dados, os 12 *loci*-MIT 49 e 5 até o presente momento não apresentam registros de isolamento no Brasil. O baixo grau discriminatório da técnica de MIRU-VNTR em linhagens de *M. bovis* já foi descrito por outros autores (PARREIRAS, 2003; ROCHA, 2009). No entanto, a técnica permitiu, em associação ao *Spoligotyping*, o agrupamento dos isolados em 12 *clusters* e 21 isolados diferenciados em perfis únicos.

A classificação genotípica dos isolados no presente estudo mostrou alta taxa de isolados clínicos de *M. bovis* em *clusters* na população estudada (46 isolados, representando 68,5% do total de 67 isolados). A subfamília BOV_1 foi a principal linhagem observada e os genótipos BOV_1/SIT698 e BOV_1/SIT481 que compreenderam 18 (26,8%) e 17 (25,3%) isolados, respectivamente, foram os mais prevalentes, seguidos do BOV_2/SIT683, com 8 (11,9%) isolados.

Esses dados concordam com os descritos por Rodriguez et al. (2004) no estado de São Paulo, que encontraram os 3 referidos genótipos na mesma ordem de frequência. O genótipo SIT 698 apresenta alta prevalência no Brasil (72,5%), e já foi identificado na Argentina (19,4%), França (4,1%), Espanha (4,1%), México (3,3%), Holanda (2,5%), Estados Unidos (0,8%), Costa Rica (0,8%) e Bélgica (0,8%) [DEMAY et al., 2012]. O genótipo SIT 481 (o segundo mais prevalente no presente estudo) é ubíquo, já tendo sido descrito na Argentina, Bélgica, Brasil, França, Alemanha, Itália, México, Holanda, África do Sul, Espanha, Suécia, Tunísia, Reino Unido, Estados Unidos e Uruguai. A França é o país onde este genótipo é mais abundante (29,7%), seguido do Brasil (18,8%) e África do Sul (14,8%) [DEMAY et al., 2012].

Na subfamília BOV_2, o genótipo SIT 683 apresenta grande número de registros no SITVIT WEB, com maior prevalência na Irlanda (53,5%) e Reino Unido (24,2%). Foi descrito como majoritário na Argentina, e também presente no Paraguai e Uruguai (Zumárraga et al., 1999). No entanto é pouco frequente no Brasil (2,2%) [DEMAY et al., 2012].

Esses 3 perfis genotípicos também foram descritos em Portugal, como genótipos compartilhados entre bovinos (*Bos spp.*) e espécies silvestres,

cervos (*Cervus elaphus*) e javalis (*Sus scrofa*), evidenciando a possibilidade de transmissão interespecífica da tuberculose (DUARTE et al., 2008). Evidências similares já foram descritas na Itália e Espanha (SERRAINO et al., 1999; ARANAZ et al., 2004; GORTAZAR et al., 2005). Situações análogas podem estar ocorrendo no Brasil, onde ainda se tem pouco conhecimento sobre identificação e importância de espécies silvestres como reservatórios da tuberculose, ou do impacto dos bovinos doentes como fontes de infecção para a fauna silvestre. Um maior número de pesquisas de vigilância epidemiológica e tipificação de linhagens de *M. bovis* traria maior aporte de conhecimento e fundamentação de atividades para o controle da bTB, especialmente nos seus estágios de erradicação (DUARTE et al., 2008).

Dentre os demais perfis encontrados no presente estudo, merecem destaque os genótipos BOV/SIT982 (1 isolado) e BOV/SIT1851 (1 isolado), ainda não descritos no Brasil. O SIT 982 já foi identificado na Espanha e França, e o SIT 1851 foi descrito na Argentina e Reino Unido (DEMAY et al., 2012).

O genótipo SIT 665 (presente em 1 isolado) foi predominantemente encontrado na França (54,6%), e já foi identificado no Brasil por Rodriguez et al. (2004). O SIT 1021 (2 isolados no presente estudo) foi descrito pelos mesmos autores no Brasil, e existem registros desse genótipo no México e na França (DEMAY et al., 2012).

O SIT 482 apresenta distribuição ubíqua, tendo sido identificado em todos os continentes, com exceção da Oceania. Há predomínio de registros em países europeus, principalmente na Alemanha e Dinamarca. O Brasil corresponde a 3,2% dos registros (DEMAY et al., 2012).

Os genótipos SIT 1852 e SIT 1853, presentes no estudo em 2 e 3 isolados, respectivamente, apresentam poucos registros no SITVIT WEB, obtidos na Argentina e Brasil. Estes mesmos países também referiram o SIT 691, a maioria na Argentina (34,3%), seguido do Brasil (11,7%), assim como o SIT 594, com 20,8% na Argentina e 16,6% no Brasil (DEMAY et al., 2012). Englobando os mesmos países, porém com menor número de registros, tem-se o SIT 1667 (1 isolamento no estudo), com 42,8% dos registros em cada uma das nações (DEMAY et al., 2012).

O SIT 2141 (3 isolados no presente estudo) apresenta raros registros no Brasil (RODRIGUEZ et al., 2004) e um na França (DEMAY et al., 2012).

Um perfil de espoligotipo não classificado em SIT, que compreendeu 2 isolamentos no estudo, com padrão octal 676773677600600, subfamília BOV_1, apresenta um outro único registro de isolamento, também no Brasil (DEMAY et al., 2012). Outro perfil “órfão” do presente estudo (padrão octal 636773676777600), que também compreendeu dois isolados, não apresenta registros no SITVIT WEB, nem classificação em família / subfamília. Assim, pode-se tratar de um novo perfil de espoligotipo.

A diversidade genética dos isolados de *M. bovis* em bovinos provavelmente pode ser atribuída ao grande fluxo de movimentação desta espécie animal que, no Brasil, ocorre principalmente devido a feiras, exposições agropecuárias, leilões e o próprio comércio de animais, que possibilitam o contato direto entre animais provenientes de diferentes regiões. Tal fato dificulta o estabelecimento de especificidade geográfica para as linhagens isoladas de *M. bovis* (SUAZO et al., 2002).

Desde o Brasil colônia há importação de bovinos para o Brasil, principalmente da Europa. Nas décadas de 1920 e 1930 esta atividade se intensificou. Nesta época não se faziam testes imunoalérgicos de forma rotineira ou como critério de compra de novos animais. Desta forma, acredita-se que muitos animais infectados tenham entrado no país nesse período (FELDMAN, 1955 *apud* PARREIRAS, 2003). Tal fato poderia justificar a ocorrência de genótipos de *M. bovis* semelhantes nos rebanhos brasileiros e europeus.

No entanto, é preciso salientar que as deleções de espaçadores no *locus* DR, as quais geram novos padrões de espoligotipos, são muito frequentes. Com efeito, padrões idênticos de espoligotipos podem ocorrer independentemente em linhagens não relacionadas (homoplasia genética). Portanto, o *Spoligotyping* pode ser um indicador pouco confiável para o estabelecimento de relações filogenéticas entre os isolados (SCHURCH et al., 2011).

Em adição, a classificação genotípica das linhagens de *M. bovis* apresenta certas limitações. Esse fato é devido a super-representação das

entradas de dados de *M. bovis* da Europa e da América do Sul (cerca de 30 e 25%, respectivamente) nos bancos de dados de análise da diversidade genotípica do MTBC. Embora limite a interpretação da epidemiologia molecular de *M. bovis* em nível global, tal fato também reflete a realidade da importância econômica da pecuária na América do Sul (Brasil e Argentina) e na Europa (BRUDEY et al., 2006).

7. CONCLUSÕES

A alta ocorrência de *M. bovis* nos linfonodos dos bovinos reforça a importância do patógeno como agente causal de linfadenite e tuberculose nos rebanhos bovinos na região do estudo;

A resistência aos antimicrobianos apresenta-se como um fenômeno complexo e multifatorial, particularmente nas espécies do MTBC. Estudos abrangentes, em diferentes regiões geográficas, são necessários para elucidar as bases da resistência aos fármacos nas linhagens de *M. bovis* isoladas de animais;

A ocorrência de isolados de *M. bovis* resistentes aos fármacos de uso no tratamento da tuberculose em humanos é preocupante no tocante à saúde pública, e reforça a necessidade de intensificação das atividades do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose no Brasil;

As abordagens de epidemiologia molecular de *M. bovis* possibilitam inferências acerca das origens geográficas das linhagens, fontes de infecção e disseminação do patógeno entre humanos e animais. Todavia, existem limitações na interpretação dos dados, que refletem a necessidade de mais estudos, em número e abrangência, envolvendo vigilância epidemiológica e tipificação molecular de linhagens de *M. bovis* associadas às ferramentas de epidemiologia clássica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales. 3ª ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 2003. 398p.

ALLIX-BÉGUEC, C.; HARMSSEN, D.; WENIGER, T.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTR_{plus}, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 2692-2699. 2008.

ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; MONTERO, N.; SANCHEZ, C.; GALKA, M.; DELSO, C.; ALVAREZ, J.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; VELA, A.I.; BRIONES, V.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 2602-2608. 2004.

BALIAN, S.C.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.2, p.11-14. 2002.

BEZOS, J.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; DE JUAN, L.; DOMÍNGUEZ, L. Bovine tuberculosis: Historical perspective. *Research in Veterinary Science*, v. 97, p.S3-S4. 2014.

BILAL, S.; IQBAL, M.; MURPHY, P.; POWER, J. Human bovine tuberculosis – remains in the differential. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 1379-1382. 2010.

BOBADILLA-DEL VALLE, M.; TORRES-GONZÁLEZ, P.; CERVERA-HERNÁNDEZ, M.E.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A.; CRABTREE-RAMIREZ, B.; CHÁVEZ-MAZARI, B.; ORTIZ-CONCHI, N.; RODRÍGUEZ-CRUZ, L.; CERVANTES-SÁNCHEZ, A.; GUDIÑO-ENRÍQUEZ, T.; CINTA-SEVERO, C.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; DE LEÓN, A.P. Trends of *Mycobacterium bovis* isolation and first-line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: a fifteen-year laboratory-based surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1-11. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. RIISPOA. Aprovado pelo Decreto 30.691 de 29 de março de 1952 e alterado pelo Decreto 1.255 de 25 de junho de 1962. Rio de Janeiro. 1952.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ª ed. 2005. 242p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – Manual Técnico. Brasília, 2006. 184p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica – Caderno 07 Tuberculose – 7ª edição. 2009. 60p.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39. 2014.

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

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; AL-HAJJOJ, S.A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J.T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; DE VIEDMA, D.G.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H.M.; GUTTIEREZ, M.C.; HAWKEY, P.M.; VAN HELDEN, P.D.; KADIVAL, G.V.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S.P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; LY, H.M.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAÏA, O.; NGEOW, Y.F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M.L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I.G.; SINGH, U.B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R.A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E.M.; SUFFYS, P.N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T.C.; WARREN, R.M.; YAP, S.F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, v. 6, n. 23. 2006.

CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n. 9, p. 3373-3381. 2004.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; LEÃO, S.C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 7, p. 745-748. 2004.

CLAEYS, W.L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, v. 31, p. 251-262. 2013.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. 2^a ed. Documento M24-A2. Wayne: 2011.

COLLINS, L.; FRANZBLAU, S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, n.5, p.1004-1009. 1997.

CORREA, C.N.; CORREA, W.M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 43, n. 3, p.131-134. 1974.

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

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures, and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, p. 77-109. 2006.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J.A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, v.30, n.1, p.36-52. 2006.

DEMAY, C.; LIENS, B.; BURGUIÈRE, T.; HILL, V.; COUVIN, D.; MILLET, J.; MOKROUSOV, I.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 4, p. 755-766. 2012.

DJELOUADJI, Z.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M.: Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infectious Diseases*, v. 11, p. 641-650. 2011.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Veterinary Epidemiologic Research. 2^a ed. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá. 2010.

DREWE, J.A.; SMTH, N.H. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*. In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. Zoonotic Tuberculosis – *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3^a ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

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

ESTEBAN, J.; ROBLES, P.; SOLEDAD JIMÉNEZ, M.; FERNÁNDEZ GUERRERO, M.L. Pleuropulmonary infections caused by *Mycobacterium bovis*:

a re-emerging disease. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 11, n. 10, p. 840-843. 2005.

EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Working document on eradication of bovine tuberculosis in the EU accepted by the Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication. Bruxelles: 2013.

FERREIRA NETO, J.S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. *Higiene Alimentar*, v. 11, p. 9-13. 1997.

FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J. M. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *TRENDS in Microbiology*, v. 9, n. 11, p. 547-553. 2001.

FITZGERALD, S.D.; SCHOOLEY, A.M.; BERRY, D.E.; KANEENE, J.B. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* isolates from Michigan white-tailed deer during the 2009 hunting season. *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 1-2. 2011.

FRANCO, M.M.J.; PAES, A.C.; RIBEIRO, M.G.; PANTOJA, J.C.F.; SANTOS, A. C. B.; MIYATA, M.; LEITE, C.Q.F.; MOTTA, R.G.; LISTONI, F.J.P. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v.9, p.85- . 2013.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; COOK, M.B.; QUENZER, V.K.; FERGUSON, R.M.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p. 362. 1998.

GALAGAN, J.E. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, p. 307-320. 2014.

GARCÍA, Y. N. Detección, caracterización y análisis funcional de la complejidad clonal en la tuberculosis humana y bovina. 2015. 213p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Complutense de Madrid, Madrid, 2015.

GLOBAL ALLIANCE FOR TB DRUG DEVELOPMENT. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents. *Tuberculosis*, v. 88, n. 2, p. 85-170. 2008.

GORTAZAR, C.; VICENTE, J.; SAMPER, S.; SAMPER, S.; GARRIDO, J.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, I.G.; GAVÍN, P.; JUSTE, R.A.; MARTÍN, C.; ACEVEDO, P.; DE LA PUENTE, M.; HÖFLE, U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in South-Central Spain. *Veterinary Research*, v. 36, p. 43-52. 2005.

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

GUINDI, S.M.; AHMED, O.L.; AWAD, W.M.; EL-SABAN, M.S.; SABAN, M.A. Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products. *Agriculture Research Review*, v. 58, n. 1, p. 75-84, 1980.

HAZBON, M.H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA-DEL VALLE, M.; CAVATORE, M.; GUERRERO, M.I.; VARMA-BASIL, M.; BILLMAN-JACOB, H.; LAVENDER, C.; FYFE, J.; GARCÍA-GARCÍA, L.; LEÓN, C.I.; BOSE, M.; CHAVES, F.; MURRAY, M.; EISENACH, K.D.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; CAVE, M.D.; PONCE DE LEÓN, A.; ALLAND, D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 2640–2649. 2006.

HEALTH PROTECTION AGENCY. Tuberculosis in the UK: Annual report on tuberculosis surveillance in the UK: 2008. London: 2008.

HLAVSA, M.C.; MOONAN, P.K.; COWAN, L.S.; NAVIN, T.R.; KAMMMERER, J.S.; MORLOCK, G.P.; CRAWFORD, J.T.; LOBUE, P.A. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, p. 186-175. 2008.

HOLLOWAY, K.L.; HENNEBERG, R.J.; BARROS LOPES, M. de; HENNEBERG, A.M.: Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *Journal of Comparative Human Biology*, v. 62, p. 402–458. 2011.

HOLSINGER, V.H.; RAJKOWSKI, K.T.; STABEL, J.R. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. *Scientific and Technical Review*, v. 12, n. 2, p.441-451. 1997.

HUGHES, V.M.; SKUCE, R.; DOIG, C.; STEVENSON, K.; SHARP, J.M.; WATT, B. Analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* from three clinical samples from Scotland. *International Journal of Tubercle Lung Disease*, v. 7, n. 12, p. 1191-1198. 2003.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.4, p.907-914.1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 781-791. 2003.

KANEENE, J.B.; KAPLAN, B.; STEELE, J.H.; THOEN, C.O. One Health approach for preventing and controlling tuberculosis in animals and humans, p. 9-20. *In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. Zoonotic Tuberculosis –*

Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria. 3^a ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

KANTOR, I. N.; TORRES, P.M.; ROXO, E.; GARIN, A.; NOACK, L.A.P.; SEQUEIRA, M.D.; IMAZ, S.M.; MORCILLO, N.; TELLES, M.A.S. *Mycobacterium bovis* infection in humans and animals with an emphasis on countries in central and South America, p. 35-49. *In*: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. Zoonotic Tuberculosis – *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3^a ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 301-308. 2000.

KAZWALA, R.R.; DABORN, C.J.; KUSILUKA, L.J.M.; JIWA, S.F.H.; SHARP, J.M.; KAMBARAGE, D.M. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, v. 30, n. 4, p. 233-239. 1998.

KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D.F. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging Microbes and Infections*, v. 3, e17. 2014.

LEITE, C.Q.; ANNO, I.S.; LEITE S.R.; ROXO, E.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 319-323. 2003.

MAJOOR, C.J.; MAGIS-ESCURRA, C.; VAN INGEN, J.; BOEREE, M.J.; VAN SOOLINGEN, D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 457-463. 2011.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 4, p. 1901-1906. 2001.

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

MOLHUIZEN, H.O.F.; BUNSCHOTEN, A.E.; SCHOULS, L.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex bacteria by Spoligotyping, p. 381-394. *In: Parish, T. & Stoker, N.G. Methods in Molecular Biology: Mycobacteria Protocols*, v. 101. 1^a ed. Totowa: Humana Press, 1998. 472p.

MUELLER, B.; DURR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C.J.; PARSONS, S.D.; VAN HELDEN, P.D.; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, p. 899-908. 2013.

MIYATA, M. Construção de um painel com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com genes de resistência a quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB. 2010. 119p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

NERO L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 211-215. 2004.

NIEMANN, S.; HARMSEN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 3231-3234. 2000.

O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Disease*, v. 76, Suplemento 1:1. 1995.

OSOBA, A.O. Microbiology of tuberculosis. *In*: Madkour, M.M. - Tuberculosis. 1^a ed. Berlim: Springer-Verlag. 2004. 928p.

PAES, A.C.; FRANCO, M.M.J. Tuberculose em animais de produção. *In*: Megid, J.; Ribeiro, M.G.; Paes, A.C. – Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1^a ed. Rio de Janeiro: Roca. 2016. 1294p.

PALOMINO, J-C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722. 2002.

PARDO, R.B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L.J.P.; CHI, K.D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 6, p. 284-287. 2001.

PARREIRAS, P.M. Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando *Spoligotyping* e MIRU-VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras. 2003. 39p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM III, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 1, p. 98-106. 2004.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RAMÓN-GARCÍA, S.; MARTÍN, C.; THOMPSON, C.J.; AÍNSA, J.A. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 Efflux Pump in Intrinsic Drug Resistance, Oxidative Stress Responses, and Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3675. 2009.

REGASSA, A.; MEDHIN, G.; AMENI, G. Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active tuberculosis in central Ethiopia. *The Veterinary Journal*, v. 178, p. 119–125. 2008.

ROCHA, A.; ELIAS, A.R.; SOBRAL, L.F.; SOARES, D.F.; SANTOS, A.C.; MARSICO, A.G.; HACKER, M.A.; CALDAS, P.C.; PARENTE, L.C.; SILVA, M.R.; FONSECA, L.; SUFFYS, P.; BOÉCHAT, N. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis*, v. 91, n. 1, p. 14-21. 2011.

ROCHA, V.C.M. Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas. 2009. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, L.; MACHADO, D.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 695-700. 2012.

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

RODWELL, T.C.; MOORE, M.; MOSER, K.S.; BRODINE, S.K.; STRATHDEE, S.A. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 909-916. 2008.

ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; DOMÍNGUEZ, L. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3405-3408. 2006.

RORING, S.; SCOTT, A.; BRITAIN, D. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using exact tandem repeats and Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 2126-2133. 2002.

SALAZAR, F.H.P. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil. 2005. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005.

SCHURCH, A.C.; KREMER, K.; KIERS, A.; BOEREE, M.J.; SIEZEN, R.J.; SOOLINGEN, D. Preferential deletion events in the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 1318-1322. 2011.

SECHI, L.A.; ZANETTI, S.; SANGUINETTI, M.; MOLICOTTI, P.; ROMANO, L.; LEORI, G.; DELOGU, G.; BOCCIA, S.; LA SORDA, M.; FADDA, G. Molecular

basis of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 1645-1648. 2001.

SERRAINO, A.; MARCHETTI, G.; SANGUINETTI, V.; ROSSI, M.C.; ZANONI, R.G.; CATOZZI, L.; BANDERA, A.; DINI, W.; MIGNONE, W.; FRANZETTI, F.; GORI, A. Monitoring transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 2766-2771. 1999.

SHERMAN, D.R.; MDLULI, K.; HICKEY, M.J.; BARRY, C. E III.; STOVER, C.K. *AhpC*, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biofactors*, v.10, n.2-3, p.211-217. 1999.

SILVA, M.R.; ROCHA, A.S.; COSTA, R.R.; ALENCAR, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; SALES, M.L.; ISSA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; PEREIRA, O.T.V.; SANTOS, E.C.; MENDES, R.S.; FERREIRA, A.M.J.; MOTA, P.M.P.C.; SUFFYS, P.N.; GUIMARÃES, M.D.C. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 321-327. 2013.

SINGH, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; SHAHDAD, S.; KAUR, M.; SINGH, B.; SHARMA, P. Nontuberculous infections in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 60, p. 14-18. 2007.

SKUCE, R.A.; McCORRY, T.P.; McCARROLL, J.F.; ROROING, S.M.; SCOTT, A.N.; BRITAIN, D.; HUGHES, S.L.; HEWINSON, R.G.; NEILL, S.D. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, v. 148, n. 1, p. 519-528. 2002.

SOBRAL, L.F.; DUARTE, R.S.; VIEIRA, G.B.O.; SILVA, M.G.; BOÉCHAT, N.; FONSECA, L.S. Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas de espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 37, n. 5, p. 664-668. 2011.

SOLA, C.; FILLIOL, I.F.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.N.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's association with VNTR and Spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, n. 1, p. 125-133. 2003.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E.; CONNELL, N.D.; KREISWIRTH, B.N.; WHITTAM, T.S.; MUSSER, J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v. 94, p. 9869-9874. 1997.

SUAZO, F.M.; RUIZ, V.B.; CASILLAS, C.R. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 55, n. 2, p. 255-264. 2002.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 762-771. 2000.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOJI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–

Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4498-4510. 2006.

TELENTI, A. Genetics of drug resistance tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, v.18, n.1, p.55-64. 1997.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, n. 10, p.2054-2058. 1993.

THOEN, C.O.; LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A. Tuberculosis in animals and humans, an introduction, p. 3-7. *In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. Zoonotic Tuberculosis – Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria*. 3ª ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

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

UJVARI, S.C.: A história da humanidade contada pelos vírus, bactérias, parasitas e outros micro-organismos. 2ª ed. São Paulo: Contexto, 2011. 202p.

WALLACE Jr., R.J.; GRIFFITH, D.E. Antimycobacterial agents, p. 489-501. *In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases – volume I*. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. 1726p.

WASHINGTON, W.; STEPHEN, A., WILLIAM J.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. 1565p.

WIRTH, T.; HILDEBRAND, F.; ALLIX-BÉGUEC, C.; WÖLBELING, F.; KUBICA, T.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; LOCHT, C.; BRISSE, S.; MEYER, A.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S.: Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 9, p. 1-10. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control 2011. Geneva: 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Drug-resistant TB; surveillance & response. Supplement: Global tuberculosis report 2014. Geneva: 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2015. Geneva: 2015.

VALVATNE, H.; SYRE, H.; KROSS, M.; STAVRUM, R.; TI, T.; PHYU, S.; GREWAL, H.M.S. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, p. 694-701. 2009.

YIM, J-J.; HOLLAND, S.M. Nontuberculous Mycobacteria. In: Madkour, M. M. (ed.) Tuberculosis. 1^a ed. Berlin: Springer-Verlag. 2004. 928p.

ZANINI, M.S. Polimorfismo de DNA em *Mycobacterium bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil. 2002. 59p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

ZHANG, H.; LI, D.; ZHAO, L.; FLEMING, J.; LIN, N.; WANG, T.; LIU, Z.; LI, C.; GALWAY, N.; DENG, J.; ZHOU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; WANG, T.; WANG, S.; HUANG, Y.; WANG, M.; ZHONG, Q.; ZHOU, L.; CHEN, T.; ZHOU, J.; YANG, R.; ZHU, G.; HANG, H.; ZHANG, J.; LI, F.; WAN, K.; WANG, J.; ZHANG, X.; BI, L. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China

identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nature Genetics*, v. 45, n. 10, p. 1255-1262. 2013.

ZHANG, Y.; TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, p. 235-254. In: Hatfull, G.F.; Jacobs, W.R. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington: ASM Press, 2000. 363p.

ZHANG, Y.; YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tubercle Lung Diseases*, v.13, n.11, p. 1320–1330. 2009.

ZOCCAL, R. Leite inspecionado no Brasil. *Revista Balde Branco*, v. 601, p. 69. 2014.

ZUMÁRRAGA, M.; MARTIN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M.E.; ERRICO, F.; RAMO, M.C.; CATALDI, A.; VAN SOOLINGEN, D.; ROMANO, M.I. Usefulness of Spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 296-303. 1999.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Journal of Infection*.

Genotyping, rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated from slaughtered bovine lymph nodes

Marília Masello Junqueira Franco^a (corresponding author)
marilia_gu@uol.com.br

Márcio Garcia Ribeiro^a
mgribeiro@fmvz.unesp.br

Fernando Rogério Pavan^b
fernandopavan@fcfar.unesp.br

Marcelo Miyata^{b,1}
marcelo_miyatabr@yahoo.com.br

Marcos Brian Heinemann^c
marcosbryan@usp.br

Antonio Francisco de Souza Filho^c
antoniosouzafilho@gmail.com

Rosilene Fressatti Cardoso^d
rfressatticardoso@gmail.com

Aryadne Larissa de Almeida^d
aryadne_almeida@hotmail.com

Ricardo Ichiro Sakate^e
ricardo.sakate@agricultura.gov.br

Antonio Carlos Paes^a
paesacmi@fmvz.unesp.br

^aDepartment of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP-Univ. Estadual Paulista, zip code: 18618-681, p.o. box: 560, Prof. Dr. Walter Mauricio Correa street, s/n, Rubiao Junior district, Botucatu, SP, Brazil – phone number: +55 14 38802100

^bLaboratory of Tuberculosis Research, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP- Univ. Estadual Paulista, zip code: 14800-903, Araraquara-Jau, km 01, Araraquara, SP, Brazil – phone number: +55 16 33014667

^cDepartment of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, USP-University of Sao Paulo, zip code: 05508-270, Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva avenue, 87, Sao Paulo, SP, Brazil – phone number: +55 11 30911383

^dDepartment of Clinical Analysis and Biomedicine, UEM-State University of Maringa, zip code: 87020-000, Colombo avenue, 5790, Maringa, PR, Brazil – phone number: +55 44 30115375

^eMinistry of Agriculture, Livestock and Supply, zip code: 18681-030, Dr. Gabriel de Oliveira Rocha street, 704, Lencois Paulista, SP, Brazil – phone number: +55 14 32693908

¹Present address: Department of Pathophysiology and Host Defense, JATA-Japan Anti-tuberculosis Association, RIT-Research Institute of Tuberculosis, zip code: 204-8533, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo, Japan – phone number: +81 42 4935711

Highlights: (3-5 bullet-points, maximum 85 characters, including spaces)

- High frequency of *M. bovis* isolated from lymphadenitis in slaughtered bovines
- 11 strains classified as MDR-TB, 8 INH-resistant and 2 RMP-resistant
- Spoligotyping and MIRU-VNTR allowed grouping of 12 clusters and 21 unique profiles
- *M. bovis* resistance to isoniazid and rifampicin raises public health concerns
- More studies approaching the genotypic diversity in *M. bovis* are required

Summary (maximum 200 words)

Objectives

Investigate the genotypic diversity of *Mycobacterium bovis* strains from bovine tuberculosis cases on the study population.

Determine the phenotypic profile of resistance and MIC values to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) of these lineages.

Evaluate possible genetic basis for such resistance.

Methods

M. bovis strains were obtained by mycobacterial culture out of 100 lymph nodes with caseous lesions. Genotyping was performed by Spoligotyping and MIRU-VNTR. REMA was used for the assessment of the phenotypic profile of resistance of the lineages, and GenoType MTBDR*plus* to the search of genetic mutations.

Results

67 isolates were obtained, 11 (16%) classified as MDR-TB, 8 (12%) INH-resistant and 2 (3%) RMP-resistant. Genetic resistance-associated mutations were not found.

Spoligotyping and MIRU-VNTR allowed the grouping of 12 clusters (68.5% of the strains), and 21 isolates with unique profiles.

Conclusions

The high frequency of *M. bovis* identified reinforces the importance of the pathogen as a major causal agent of lymphadenitis and tuberculosis in cattle in the study area. The resistance of the lineages to first-line drugs used in the human treatment of tuberculosis raises public health concerns. Further studies are required to elucidate the basis of drug resistance and the occurrence of genotypic diversity in *M. bovis* strains.

Key words: bovine tuberculosis, multidrug-resistant, genotypic profile, bovine lymphadenitis

Introduction

Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* (bTB) is a zoonosis of worldwide distribution with broad host range. Although primarily affects cattle, it can be transmitted to humans by the consumption of milk and dairy products without pasteurization or other heat treatment. Also, by the inhalation of infectious aerosols, mainly in immunosuppressed individuals, such as people living with HIV/AIDS (HLAVSA et al., 2008). There is significant variation in terms of how different microorganisms of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) species affect specific hosts, including humans. However, there are also important intersections between animals and humans with regard to tuberculosis epidemiology. The best example is the occurrence of bTB in humans, domestic animals and wildlife (THOEN et al., 2014).

In developed countries, currently bTB corresponds to about 1 to 2% of tuberculosis cases in humans (HLAVSA et al., 2008; MUELLER et al., 2013). In contrast, in developing nations, particularly in the poorest regions of Africa, where bTB remains prevalent and milk pasteurization or surveillance activities for slaughter are not extensively practiced, it is estimated that on average 10 to 20% cases of human tuberculosis are caused by *M. bovis* (MUELLER et al., 2013). Studies in Mexico have reported greater prevalences, as peak of 40% in annual rates (BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015).

M. bovis infection in humans is worrisome, as its chronic clinical course is undistinguishable from tuberculosis caused by *M. tuberculosis* (CARDOSO et al., 2009). Humans acts as accidental hosts of *M. bovis* (BILAL et al., 2010). However, bTB in humans is as severe as that caused by *M. tuberculosis*, and can even be more lethal (RODWELL et al., 2008; MAJOOR et al., 2011).

Most laboratories in developing countries do not routinely perform mycobacterial cultures, and only a few laboratories have conditions to identify *M. bovis*. Indeed, it is believed that the number of human cases of *M. bovis* infections is underestimated (BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015). Differentiation of mycobacterial species responsible for pulmonary tuberculosis is often not sought. Use of inappropriate diagnostic protocols or laboratory techniques (e.g., the use of culture media or compounds, such as glycerol, that inhibits *M. bovis*), or lack of additional testing to identify the causative agents at the species levels, contributes to underreporting of human bTB (KANEENE et al., 2014).

Notwithstanding the great spread of tuberculosis, the emergence and the spread of multidrug-resistant strains (MDR-TB), extensively drug-resistant (XDR-TB),

and the totally drug-resistant lineages (TDR-TB) poses a emergent human health threat [GALAGAN, 2014]. *M. bovis* is naturally resistant to pyrazinamide (KANEENE, et al., 2014). Furthermore, all over the world there are few studies investigating the resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) in *M. bovis* strains from cattle, wildlife reservoirs and human cases of tuberculosis (SECHI et al., 2001; FITZGERALD et al., 2011; BOBADILLA-DEL VALLE et al., 2015).

The investigation of the genetic diversity of *M. bovis* isolates can improve the understanding of structure and population dynamics of the pathogen as well as their transmission patterns. Moreover, it contributes to the success of bTB control and eradication programs (DUARTE et al., 2008). To address this questions, the association of Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) and MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing) has been used for the characterization of *M. bovis* in most laboratories, for being standardized, fast and cost-effective techniques (ROMERO et al, 2006; SUPPLY et al., 2006).

In parallel to the impact in public health, bTB has a high economic importance in the agricultural context worldwide, because it directly affects animal productivity, requires the compulsory slaughter of infected animals and influences international trade of animal products (RODRIGUEZ et al., 2004; MICHEL et al., 2010).

The aims of the current study were to investigate the genotypic diversity of *M. bovis* strains isolated from slaughtered bovine lymph nodes using Spoligotyping and 12-*loci* MIRU-VNTR. Likewise, to determine these lineages' phenotypic profile of resistance and MIC values to INH and RMP and evaluate possible genetic basis for such resistance.

Materials and Methods

Sample collection

One hundred cattle lymph nodes that had gross lesions of lymphadenitis (granulomas, *caseum*, lymphadenopathy) were randomly collected in different carcasses, from different herds of the southeast region of Brazil. The collection of the samples occurred between august of 2014 and may of 2015, during the official veterinary postmortem examinations in the slaughter line of a slaughterhouse inspected by the Federal Inspection Service (SIF) in the central region of Sao Paulo state, Brazil. The bovine herds' locations included 26 different cities of Sao Paulo state and one of Minas Gerais state. The entire lymph nodes were collected and individually placed in sterile stomacher bags (Twirl'EM™ - Labplas, Ste-Julie, Canada). The

samples were immediately stored on ice in isothermal boxes (4 to 8°C) until their arrival at the laboratory, and kept frozen (-20°C) until the cultivation time.

Mycobacterial cultures

To avoid contamination or biological risk, the samples were processed in a class II biological safety cabinet properly cleaned with 10% sodium hypochlorite and 70% alcohol, followed by exposure to ultraviolet light for 30 minutes, with the air circulation system turned on. A 1g aliquot of each lymph node, in *foci* presenting lesions, was selected for microbiological examination. Each aliquot was disposed in sterile Petri dishes, macerated and then transferred into a screw-top centrifuge tube.

The Petroff's sodium hydroxide decontamination method (BALIAN et al., 2002) was carried out on each sample prior to culture on Löwenstein-Jensen and Stonebrink media. Cultures were incubated aerobically at 37°C for 90 days and examined weekly. All colonies exhibiting phenotypes suggestive of mycobacteria were stained using the Ziehl-Neelsen method. Acid-fast bacilli (AFB) positive colonies were confirmed to be *M. bovis* by Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR-based species identification

Genomic DNA extraction was performed by thermolysis (MAZARS et al., 2001). A loopful (10µL) of mycobacteria was suspended in 300µL of Tris-HCl buffer (pH 8.0) in DNase/RNase-free microcentrifuge tubes, boiled for 10 minutes and frozen (-86°C) for 10 minutes. These boiling and freezing processes were repeated three times.

The molecular species identification of the isolates was performed by *gyrB*-RFLP, according to Chimara et al. (2004). For the PCR, 1µL of the supernatant containing the DNA, 47µL of PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and 10pMol of each primer MTUBf (5'-TCGGACGCGTATGCGATATC-3') and MTUBr (5'-ACATACAGTTCGGACTTGCG-3') were combined. The PCR protocol consisted of an initial denaturation step for 10 minutes at 95°C; 35 amplification cycles, each consisting of 1 minute at 94°C, 1 minute at 65°C and 1.5 minutes at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C. This reaction amplified a 1020-bp fragment of the *gyrB* gene [CHIMARA et al., 2004]. Positive control with *M. bovis* AN5 DNA and negative control consisting of PCR solution mixture without DNA were included in each set of reactions. Electrophoresis on 1% agarose gel (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) stained with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) using a 100-bp molecular-weight marker (DNA Express, Guarulhos, SP, Brazil) confirmed the amplification of the fragments.

The amplicons were further digested using the restriction enzymes *RsaI*, *TaqI* and *SacII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The restriction digests were separated on a 2% agarose gel stained with GelRed™ using 50- and 100-bp molecular-weight markers (DNA Express, Guarulhos, SP, Brazil). The results were compared with the patterns described by Chimara et al. (2004). Samples identified as *M. bovis* were submitted to genotyping techniques and drug-susceptibility testing.

MIRU-VNTR typing

MIRU-VNTR genotyping was performed using the primer sets for the 12 MIRU *loci* 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 and 40 as previously described (SUPPLY et al., 2006). For each *locus* amplification, one pair of primers in one PCR reaction was used. The PCR mixture consisted of 1µL of the extracted genomic DNA, 18µL of PCR Master Mix (2X) and 10pMol of each primer. All PCR reactions were carried out under the following conditions: an initial denaturation step for 10 minutes at 95°C followed by 40 amplification cycles, each consisting of 1 minute at 94°C, 1 minute at 60°C and 1.5 minutes at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C. The product of PCR was subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with GelRed™, using a 100-pb molecular weight marker.

For each *locus*, the amplicon size on each sample was classified in alleles according to Supply et al. (2006). The profile of each sample was analyzed using the latest release of the international database SITVIT WEB (DEMAY et al., 2012), to find the corresponding MIT (MIRU International Type) number in each isolate.

Spoligotyping

Spoligotyping was carried out on the extracted genomic DNA of all *M. bovis* lineages. For the PCR amplification of the DR *locus*, 1µL of the extracted genomic DNA, 22µL of PCR Master Mix (2X) and 10pMol of each primer DRa (5'-GGTTTTGGGTCTGACGA-3', 5' biotinylated) and DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') [KAMERBEEK et al., 1997] were combined. The PCR protocol consisted of an initial denaturation step for 3 minutes at 96°C; 20 amplification cycles, each consisting of 1 minute at 96°C, 1 minute at 55°C and 30 seconds at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

The PCR products were hybridized with a set of 43 spacer oligonucleotides covalently linked to an in-house-prepared spoligo-membrane, according to Molhuizen et al., 1998. Briefly, Biodyne™ C Membrane (Pall Corporation, Port Washington, NY,

USA) was activated with 10mL of 16% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC) [Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA] solution. The 43 spacer oligonucleotides sequences, as described by Kamerbeek et al. (1997), were applied in order on the membrane in parallel by using a 45 slots miniblotted system (Immuntics, Boston, MA, USA). A 2 minutes incubation period, at room temperature, ensured that the oligonucleotides bound covalently to the membrane. The membrane was further inactivated with 100mM NaOH and washed twice in 2X saline-sodium-phosphate-EDTA (SSPE) solution [Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA] supplemented with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) [Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA].

For hybridization, 20µL of the PCR products were diluted in 150µL 2X SSPE-0.1% SDS, heat denatured at 100°C for 10 minutes, and immediately cooled on ice. The diluted samples were pipetted in the membrane using the miniblotted slots, perpendicularly to the rows of oligonucleotides deposited previously. The miniblotted set containing the membrane was incubated at 60°C for 60 minutes. The membrane was washed twice in 2X SSPE-0.5% SDS at 60°C for 10 minutes each time, cooled down, and then incubated in 2X SSPE-0.5% SDS with streptavidin-peroxidase conjugate (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) inside of a rolling bottle at 42°C for 45 to 60 minutes. The membrane was washed twice in 2X SSPE-0.5% SDS pre-heated at 42°C for 10 minutes, and rinsed twice in 2X SSPE at room temperature for 5 minutes each time.

Detection of the hybridizing DNA was done by chemiluminescence with Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions, followed by exposure to X-ray film (Kodak, Rochester, NY, USA) for 30 minutes. The autoradiograms were obtained using standard X-ray film processing photochemical products (Kodak, Rochester, NY, USA) in accordance with manufacturer's instructions. Spoligotypes in binary and octal formats were compared with the online database SITVIT WEB (DEMAY et al., 2012), thus ensuring the identification of Spoligotyping International Types (SIT) of the lineages.

Drug susceptibility testing

The drug susceptibility testing of the *M. bovis* strains assessed by the resazurin microtiter assay (REMA) [PALOMINO et al., 2002]. The technique was carried out with standardized bacterial inoculums, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 as the reference strain, 96-well plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and sodic resazurin (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) to reveal bacterial viability

and growth. Each test was carried out in triplicate. Minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial agents was defined as the lowest concentration that inhibited 90% of the bacterial population *in vitro* growth (COLLINS and FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU et al., 1998). The qualitative classification of isolates as "sensitive" or "resistant" was based on cut-off points established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) of 0.1µg/mL to INH and 1.0µg/mL to RMP (CLSI, 2011).

Stock solutions at concentrations of 10mg/mL of INH and RMP (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared in sterile distilled water and dimethyl sulfoxide (DMSO) [Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA], respectively. Resazurin sodium salt powder was diluted at 0.01% (w/v) in distilled water, and filter sterilized. REMA method was performed in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC) [Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA]. Antimicrobial stock solutions were diluted 1:100 (100µg/mL) in the mentioned media (given rise to the working solutions), as well as the bacterial inoculums, which were prepared adjusting the turbidity to the McFarland tube standard no. 1 and then diluted 1:20 (100µL was used as an inoculum).

Serial two-fold dilutions of each drug in 100µL of Middlebrook 7H9-OADC were prepared directly in 96-well plates with concentrations for both antibiotics ranging of 25.0 to 0.098 µg/mL. Growth controls (containing no antibiotics) and sterility controls (without inoculum) were also included in each plate. One isolate was tested per plate. The plates were covered, sealed with Brand™ Parafilm™ M (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and incubated in 5% CO₂ supplemented atmosphere at 37°C for 7 days. After this period, 30µL of resazurin solution was added to each well and incubated overnight, at the same conditions. The assessment of color changes was done by visual and quantitative fluorescence inspection of plates, using Cytation™ 3 cell imaging multi-mode microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). A color change from blue to pink indicates reduction of resazurin and therefore bacterial growth. The MIC₉₀ was defined as the lower drug concentration that prevented this color change.

Detection of genetic mutations

In all the phenotypically resistant *M. bovis* lineages, the assessment of INH- and RMP-resistance-associated possible genetic mutations was performed using the GenoTypeMTBDR*plus* version 2.0 commercial kit (Hain Lifescience, Nehren Tubingen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The test uses a line probe assay technology (endorsed by WHO since 2008) and it is based on a multiplex

amplification with biotinylated primers and a reverse hybridization. The identification of RMP resistance is enabled by the detection of the most significant associated of the *rpoB* gene (coding for the β -subunit of the RNA polymerase). For the INH resistance, the *katG* gene (coding for the catalase-peroxidase) and the promoter region of the *inhA* gene (coding for the enoyl-ACP-reductase) are examined.

Results

Among the 100 bovine lymph nodes with caseous lesions that were processed, 67 isolates compatible with *Mycobacterium* sp were obtained. The *gyrB*-RFLP analysis revealed that all isolates obtained were *M. bovis* and thus, the 67 lineages underwent the REMA, Spoligotyping and MIRU-VNTR techniques.

Genotyping data

Spoligotyping of 67 strains resulted in 16 different spoligotype patterns, of which 14 were classified as known SITs (corresponding to 63 isolates) and 2 profiles unknown, or "orphans" (corresponding to 4 isolates), as shown in Table 1. The clade BOV_1 predominated with 77.6% (52/67) of the isolates. The clade BOV_2 was represented by 11.9% (8/67) of the isolates and 7.4% (5/67) of the isolates were included in the clade BOV. Two "orphans" isolates belonged to an unregistered profile in the online database SITVIT WEB (DEMAY et al., 2012), therefore were not classified in clades. In BOV_1, were identified the following SIT: 481, 482, 594, 665, 691, 698, 1021, 1667, 1852, 2141 and 2 isolates without shared type. The clade BOV_2 was the second most frequent, with the isolates belonging to SIT 683. In addition, SITs 982, 1851 and 1853 were identified in BOV family.

The MIRU-VNTR analysis using 12 classical MIRUs *loci* identified 31 isolates belonging to the MIT 49, 1 isolate belonging to MIT 5, and 35 isolates considered "orphans", or unknown MIT (Table 1). The combination of Spoligotyping and MIRU-VNTR analysis allowed the grouping of the isolates in 12 clusters (defined as two or more isolates having identical genotypes), grouping 68.5% of the strains (46 isolates in total), whereas 21 isolates showed unique profiles.

Phenotypic resistance to isoniazid and rifampicin

The REMA plate method revealed 21 isolates (31% of total) with phenotypic resistance to the tested drugs. Among these, 11 (16%) were classified as MDR-TB. Other 8 isolates (12%) were resistant to INH and 2 (3%) were resistant to RMP. The

MIC₉₀ values and the qualitative classification of *in vitro* sensibility profile of the *M. bovis* lineages to INH and RMP are shown in Table 2.

Detection of genetic mutations

The search for INH- and RMP-resistance-related genetic mutations using the GenoType MTBDR*plus* version 2.0 did not show the presence of mutations in any of the phenotypically resistant isolates.

Discussion

Recent data suggest that the emergence of drug resistance and the transmissibility patterns of mycobacteria, are strongly influenced by the genetic and evolutionary scenario of MTBC (DJELOUADJI et al., 2011). Understanding the mechanisms of mycobacterial drug resistance is essential to develop faster molecular diagnostic tools and to outline new antitubercular drugs, as well as to improve the implementation of prevention measures against the resistance development in mycobacteria strains (MIYATA, 2010).

Among the 67 obtained isolates of *M. bovis*, 21 (31.3%) showed some sort of resistance to the tested drugs. Among these, 11 (16%) were classified as MDR-TB, 8 (12%) were resistant to INH and 2 (3%) were resistant to RMP. These data contrast with those obtained by Fitzgerald et al. (2011) in *M. bovis* strains obtained from Michigan's wild white-tailed deer (considered as the primary tuberculosis reservoirs for domestic cattle in Michigan) during a hunting season, which did not find drug-resistance in the microorganisms using the proportions method and Bactec™ system. However, in Italy, Sechi et al. (2001) reported 22.7% of multidrug resistance, as well as 22.7% of RMP-resistance, and 18.9% of INH-resistance in *M. bovis* strains from cattle herds.

In Brazil, back in 1974, Correa and Correa already reported drug-resistance in 7 *M. bovis* strains out of 200 samples of human tuberculosis cases, 3 of them were MDR-TB. Parreiras (2003) found no phenotypic resistance to INH and RMP in *M. bovis* strains isolated from caseous lesions in cattle by qualitative assessment on solid culture media with pre-established concentrations of antimicrobials. However, Zanini (2002) reported 2.4% of INH-resistance in *M. bovis* lineages from the same type of lesions in cattle.

In our study, the identification of mono and multidrug-resistance in *M. bovis* strains isolated from cattle to first-line drugs used on human tuberculosis treatment raises public health concerns and addresses the need for the intensification of

epidemiological surveillance of bovine tuberculosis in national territory. It is noteworthy that the institution of the PNCEBT in 2001 by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) prohibited the treatment of infected cattle (BRAZIL, 2006).

The natural drug resistance in MTBC species represents a barrier to tuberculosis treatment and control. This intrinsic resistance is attributed to the peculiar constitution of the mycobacterial cell wall, and the active efflux pumps systems (DE ROSSI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012). In parallel, studies have revealed the existence of other systems that neutralize drugs actions, as well as the acquisition of chromosomal mutations, which in turn provide high levels of resistance to antimicrobials (RAMÓN-GARCÍA et al., 2009).

Although it may be influenced by multiple factors, the *Mycobacterium* sp. resistance to antimicrobials is often associated with mutations in target-encoding or related genes (KOCH et al., 2014). In the current study, the search of drug resistance-associated genetic mutations occurred by screening the hot spots for INH- and RMP-resistance in the *rpoB* and *katG* genes and in the promoter region of the *inhA* gene, using DNA probes for wild type sequences and for the most frequently encountered mutations that mediate antimicrobial resistance in *M. tuberculosis*. None of the 21 tested strains presented mutations covered by the commercial kit MTBDR*plus* version 2.0.

Chromosomal mutations did not elucidate all cases of mycobacterial resistance. In fact, approximately 20–30% of INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates do not have mutations in any of the genes associated with INH resistance. (RODRIGUES et al., 2012). In contrast, for RMP the occurrence of genetic mutations has been most commonly associated with resistance, especially in the hot spot region of the *rpoB* gene. However, rare cases, corresponding to 2 to 4% of the clinical isolates, do not have these mutations (TELENTI et al., 1997). Moreover, the mechanisms for drug resistance are only partially understood, and it is unclear whether the current understanding of the genetic basis of antimicrobial resistance in *M. tuberculosis* is sufficiently comprehensive (ZHANG et al., 2013).

Recent studies have also discovered new genes and/or intergenic regions associated with antimicrobial resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis*, and have identified various single-nucleotide polymorphisms with consistent associations with drug resistance in comparison with the *M. tuberculosis* H37Rv reference genome. Zhang et al. (2013) reported the identification of 14 new genes strongly associated with drug resistance by analyzing a collection of drug-sensitive, MDR- and XDR-*M.*

tuberculosis strains in China. In the same study, the authors pointed out a panel of 84 genes possibly related to antimicrobial resistance, 24 of them (including 10 of 12 well-known drug resistance-associated genes) are considered to be essential. Moreover, the authors underscore the importance of future studies of these genes.

Data regarding the genetic bases for drug-resistance in *M. bovis* are still very limited, especially the strains isolated from animals. Since bovine tuberculosis sets up one of the biggest threat of infectious diseases in cattle globally, it is essential to control and prevent the transmission of MDR-*M. bovis* to humans (SECHI et al., 2001). Facing the emergence of multidrug resistant *M. bovis*, similar approaches comprising the genome of drug-resistant *M. bovis* clinical strains compared to *M. bovis* BCG (Calmette-Guérin bacillus) reference genome are essential, aiming to elucidate whether there are differences in drug resistance-associated genetic mutation patterns in *M. tuberculosis* and *M. bovis*. These potential differences could explain, at least in part, the absence of identification of genetic mutations on drug-resistant *M. bovis* lineages in our study. The surveillance of drug resistance among *M. bovis* lineages can provide subsidies for the implementation of more effective therapeutic measures in bTB, to optimize the use of public financial resources in health systems and, consequently, to reduce the risk of transmission for humans.

The application of genotyping techniques have unraveled the clonal populational structure of the MTBC, which comprises distinct phylogenetic lineages characterized by differences in their geographical distributions, immunogenicities, virulence and associations with multidrug resistant tuberculosis (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008). Among the various genotyping methods to study the genotypic diversity of MTBC, Spoligotyping and MIRU-VNTR recently received international approval as robust, rapid and highly reproducible methods, capable of generating data on a portable format between laboratories and researchers (DEMAY et al., 2012).

The MIRU-VNTR technique, with its classical 12-*loci* format, identified a cluster of 31 isolates belonging to MIT 49, an isolates belonging to MIT 5, and 35 isolates considered "orphans" or unknown MIT. These data are in accordance with the classification described by Demay et al. (2012) on the institution of the largest currently available international database for the study of genetic diversity and molecular epidemiology of MTBC, the SITVIT WEB. According to this database, to date, the MITs 49 and 5 have not been reported in Brazil. The low discriminatory power of MIRU-VNTR in *M. bovis* strains has been described previously (PARREIRAS, 2003; ROCHA, 2009). In the current study, MIRU-VNTR combined with Spoligotyping results has allowed the grouping of the isolates in 12 clusters and 21 unique profiles.

Spoligotyping and MIRU-VNTR in this study showed a high rate of clinical isolates of *M. bovis* in clusters in the studied population (46/67 isolates, representing 68.5% of total). The BOV_1 was the main genotypic lineage observed, BOV_1/SIT698 and BOV_1/SIT481 genotypes, that comprised 18 (26.8%) and 17 (25.3%) isolates, respectively, were the most prevalent, followed by BOV_2/SIT683, with 8 (11.9%) isolates. These data are in accordance with those described by Rodriguez et al. (2004) in the same region. The authors referred the same three genotypes in the same order of frequency. The SIT 698 genotype is highly prevalent in Brazil (72.5%), and has been identified in Argentina (19.4%), France (4.1%), Spain (4.1%), Mexico (3.3%), the Netherlands (2.5%), United States (0.8%), Costa Rica (0.8%) and Belgium (0.8%) [DEMAY et al., 2012]. The SIT 481 (the second most prevalent in our study) is ubiquitous and was described in Argentina, Belgium, Brazil, France, Germany, Italy, Mexico, Netherlands, South Africa, Spain, Sweden, Tunisia, United Kingdom, United States and Uruguay. France is the country where this genotype is more abundant (29.7%), followed by Brazil (18.8%) and South Africa (14.8%) [DEMAY et al., 2012]. In BOV_2 subfamily, the SIT 683 has a large number of records in SITVIT WEB, with a higher prevalence in Ireland (53.5%) and the UK (24.2%). It was described as the majority in Argentina, and also present in Paraguay and Uruguay (ZUMÁRRAGA et al., 1999), whereas is uncommon in Brazil (2.2%) [DEMAY et al., 2012].

These 3 genotypic profiles were also reported in Portugal, as shared genotypes among cattle (*Bos spp.*) and wild species, such as deer (*Cervus elaphus*) and wild boars (*Sus scrofa*), indicating the possibility of interspecific transmission of tuberculosis (DUARTE et al., 2008). Similar evidence has been described in Italy and Spain (SERRAINO et al., 1999; ARANAZ et al., 2004; GORTAZAR et al., 2005). Analogous situations may be occurring in Brazil, which still have little knowledge about identification and importance of wild animal species as tuberculosis reservoirs in national territory, or the role of sick cattle as a source of infection for wildlife. A greater number of epidemiological surveillance research and *M. bovis* strains genotypic characterization would bring greater knowledge and reasoning for control activities of bTB, especially in its eradication stages (DUARTE et al., 2008).

Among the other identified profiles, it is worth mentioning the genotypes BOV/SIT982 (1 isolate) and BOV/SIT1851 (1 isolate), not yet described in Brazil. The SIT 982 has been identified in the Spain and France, and the SIT 1851 was described in Argentina and the United Kingdom (DEMAY et al., 2012).

The SIT 665 genotype (1 isolate in the study) was predominantly found in France (54.6%), and has already been identified in Brazil by Rodriguez et al. (2004).

The SIT 1021 (2 isolates in this study) was described by the same authors in Brazil and there are records in Mexico and France. The SIT 482 has ubiquitous distribution and have been identified in all continents except Oceania. There is a predominance of European records, mainly in Germany and Denmark. Brazil corresponds to 3.2% of the records. The SITs 1852 and 1853, present in the study in 2 and 3 isolates, respectively, have few records in SITVIT WEB, obtained in Argentina and Brazil. These countries also reported the SIT 691, mostly in Argentina (34.3%), followed by Brazil (11.7%), as well as the SIT 594, with 20.8% in Argentina and 16.6% in Brazil. Encompassing the same countries, but with fewer records, there is the SIT 1667 (1 isolation in our study), with 42.8% of the records in each of the nations (DEMAY et al., 2012). The SIT 2141 (3 isolates in our study) shows rare records in Brazil and France (RODRIGUEZ et al., 2004; DEMAY et al., 2012).

A spoligotype without a known SIT, which included 2 isolates in the present study (octal pattern 676773677600600), included in BOV_1 clade, presented a single report of isolation, also in Brazil (DEMAY et al., 2012). Another "orphan" pattern (octal pattern 636773676777600), which also comprised 2 isolates of our study, has no records on SITVIT WEB or classification in clades. It may be a new spoligotype profile.

The genetic diversity of *M. bovis* lineages in cattle can probably be attributed to the indiscriminate movement of animals between herds, which in Brazil occurs mainly due to trade, agricultural exhibitions and auctions, which allow direct contact between animals from different regions. Indeed, these transit activities complicates the establishment of geographical specificity for *M. bovis* strains (SUAZO et al., 2002). Nationally, bovine TB is still a major animal health problem, although it is distributed at different rates throughout the Brazilian territory (PAES & FRANCO, 2016). According to the latest data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), Brazil has the second largest cattle herd in the world, surpassed only by India. Nationally, the bovine livestock sector is one of the main items of agribusiness. Furthermore, is still promising and has growth trends. In 2014, the national total number of cattle was 212.34 million animals, an increase of 0.3% compared to that recorded in 2013 (BRAZIL, 2014). The country has more than 4.000 slaughterhouses, which together process more than 21 million bovines for internal consumption and for export (KANTOR et al., 2014). Thus, it is essential to provide high quality and low risk animal products to the national and external customers, who are increasingly exigent (BRAZIL, 2006).

Since the Brazil's colonial epoch, there is cattle trade and import to Brazil, mainly from Europe. In the 1920s and 1930s this activities were intensified. At that

time, tuberculin tests were not used routinely or as a criterion for the purchase of new animals. Thus, it is believed that many infected animals have entered the country during this period (FELDMAN, 1955 *apud* PARREIRAS, 2003). This fact may explain the occurrence of similar *M. bovis* genotypes in Brazilian and European livestock.

However, it should be noted that deletions of spacers in the DR *locus*, which generate new spoligotypes, are very common. In fact, similar patterns of spoligotypes can occur independently in unrelated lineages (genetic homoplasy), so the Spoligotyping can be a poor indicator for establishment of phylogenetic relationships between strains (SCHURCH et al., 2011). In addition, the genotypic classification of *M. bovis* strains has some limitations. This fact is due to the overrepresentation of *M. bovis* data entries from Europe and South America (about 30 and 25%, respectively) in the databases for analysis of genotypic diversity of MTBC. Although it limits the interpretation of *M. bovis* molecular epidemiology on a global level, it reflects the economic importance of cattle breeding in South America (Brazil and Argentina) and Europe (BRUDEY et al., 2006).

The high incidence of *M. bovis* in cattle lymph nodes reinforces the importance of the pathogen as the causal agent of lymphadenitis and tuberculosis in cattle herds in the study area. The occurrence of isolates of *M. bovis* resistant to first-line drugs used to treat human tuberculosis raises public health concerns, and reinforces the need to intensify the activities of the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis in Brazil. Antimicrobial resistance is a complex and multifaceted phenomenon, particularly in species of MTBC. Comprehensive studies in different geographical areas around the world are necessary to elucidate the basis of drug resistance in *M. bovis* strains isolated from animals.

The approaches of molecular epidemiology in *M. bovis* lineages allow to make inferences about its geographical origins, possible sources of infection for hosts and the pathogen spread between humans and animals. However, there are some limitations in interpreting global *M. bovis* genetic diversity, which reflects the need for more studies, in different geographical areas, involving epidemiological surveillance and molecular typing of *M. bovis* strains.

Acknowledgements

Grant #2014/04929-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Declaration of interest

Conflict of interests: none.

References

ALLIX-BÉGUEC, C.; HARMSSEN, D.; WENIGER, T.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S. Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTR $plus$, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 2692-2699. 2008.

ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; MONTERO, N.; SANCHEZ, C.; GALKA, M.; DELSO, C.; ALVAREZ, J.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; VELA, A.I.; BRIONES, V.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 2602-2608. 2004.

BALIAN, S.C.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 11-14. 2002.

BILAL, S.; IQBAL, M.; MURPHY, P.; POWER, J. Human bovine tuberculosis – remains in the differential. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 1379-1382. 2010.

BRAZIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Secretary of Agricultural Defense. National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis – Technical Manual. Brasília, DF, Brazil. 2006. 184p.

BRAZIL. Ministry of Planning, Budget and Management. Brazilian Institute of Geography and Statistics. Municipal Livestock Production. Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39. 2014.

BOBADILLA-DEL VALLE, M.; TORRES-GONZÁLEZ, P.; CERVERA-HERNÁNDEZ, M.E.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A.; CRABTREE-RAMIREZ, B.; CHÁVEZ-MAZARI, B.; ORTIZ-CONCHI, N.; RODRÍGUEZ-CRUZ, L.; CERVANTES-SÁNCHEZ, A.; GUDIÑO-ENRÍQUEZ, T.; CINTA-SEVERO, C.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; DE LEÓN, A.P. Trends of *Mycobacterium bovis* isolation and first-line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: a fifteen-year laboratory-based surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1-11. 2015.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; AL-HAJOJ, S.A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRONE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J.T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; DE VIEDMA, D.G.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H.M.; GUTTIEREZ, M.C.; HAWKEY, P.M.; VAN HELDEN, P.D.; KADIVAL, G.V.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S.P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; LY, H.M.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAĪA, O.; NGEOW, Y.F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M.L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I.G.; SINGH, U.B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R.A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E.M.; SUFFYS, P.N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T.C.; WARREN, R.M.; YAP, S.F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, v. 6, n. 23. 2006.

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

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; LEÃO, S.C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 7, p. 745-748. 2004.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. 2nd ed. Document M24-A2. Wayne: 2011.

COLLINS, L.; FRANZBLAU, S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, n.5, p.1004-1009. 1997.

CORREA, C.N.; CORREA, W.M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v. 43, n. 3, p.131-134. 1974.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J.A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiology Reviews, v.30, n.1, p.36-52. 2006.

DEMAY, C.; LIENS, B.; BURGUIÈRE, T.; HILL, V.; COUVIN, D.; MILLET, J.; MOKROUSOV, I.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infection, Genetics and Evolution, v. 12, n. 4, p. 755-766. 2012.

DJELOUADJI, Z.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M.: Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. Lancet Infectious Diseases, v. 11, p. 641-650. 2011.

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

FITZGERALD, S.D.; SCHOOLEY, A.M.; BERRY, D.E.; KANEENE, J.B. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* isolates from Michigan white-tailed deer during the 2009 hunting season. Veterinary Medicine International, v. 2011, p. 1-2. 2011.

GALAGAN, J.E. Genomic insights into tuberculosis. Nature Reviews Genetics, v. 15, p. 307-320. 2014.

GORTAZAR, C.; VICENTE, J.; SAMPER, S.; SAMPER, S.; GARRIDO, J.; FERNANDÉZ-DE-MERA, I.G.; GAVÍN, P.; JUSTE, R.A.; MARTÍN, C.; ACEVEDO, P.; DE LA PUENTE, M.; HÖFLE, U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in South-Central Spain. Veterinary Research, v. 36, p. 43-52. 2005.

HLAVSA, M.C.; MOONAN, P.K.; COWAN, L.S.; NAVIN, T.R.; KAMMMERER, J.S.; MORLOCK, G.P.; CRAWFORD, J.T.; LOBUE, P.A. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, p. 186-175. 2008.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.4, p.907-914.1997.

KANEENE, J.B.; KAPLAN, B.; STEELE, J.H.; THOEN, C.O. One Health approach for preventing and controlling tuberculosis in animals and humans, p. 9-20. In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. *Zoonotic Tuberculosis – Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

KANTOR, I. N.; TORRES, P.M.; ROXO, E.; GARIN, A.; NOACK, L.A.P.; SEQUEIRA, M.D.; IMAZ, S.M.; MORCILLO, N.; TELLES, M.A.S. *Mycobacterium bovis* infection in humans and animals with an emphasis on countries in central and South America, p. 35-49. In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. *Zoonotic Tuberculosis – Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. Ames: Willey Blackwell, 2014. 413p.

KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D.F. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging Microbes and Infections*, v. 3, e17. 2014.

MAJOOR, C.J.; MAGIS-ESCURRA, C.; VAN INGEN, J.; BOEREE, M.J.; VAN SOOLINGEN, D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 457-463. 2011.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 4, p. 1901-1906. 2001.

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

MIYATA, M. Construção de um painel com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com genes de resistência a quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB. 2010. 119p. Thesis - Faculty of Pharmacy, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

MOLHUIZEN, H.O.F.; BUNSCHOTEN, A.E.; SCHOOLS, L.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex bacteria by Spoligotyping, p. 381-394. In: Parish, T. & Stoker, N.G. *Methods in Molecular Biology: Mycobacteria Protocols*, v. 101. 1st ed. Totowa: Humana Press, 1998. 472p.

MUELLER, B.; DURR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C.J.; PARSONS, S.D.; VAN HELDEN, P.D.; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, p. 899-908. 2013.

PAES, A.C.; FRANCO, M.M.J. Tuberculose em animais de produção, p. 512-542. In: Megid, J.; Ribeiro, M.G.; Paes, A.C. – *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. 1st ed. Roca. 2016. 1294p.

PALOMINO, J-C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722. 2002.

PARREIRAS, P.M. Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando Spoligotyping e MIRU-VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras. 2003. 39p. Thesis – School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, SP, Brazil.

RAMÓN-GARCÍA, S.; MARTÍN, C.; THOMPSON, C.J.; AÍNSA, J.A. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 Efflux Pump in Intrinsic Drug Resistance, Oxidative

Stress Responses, and Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3675. 2009.

ROCHA, V.C.M. Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de Spoligotyping, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas. 2009. 97p. Masters dissertation – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, USP-University of Sao Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

RODRIGUES, L.; MACHADO, D.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 695-700. 2012.

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

RODWELL, T.C.; MOORE, M.; MOSER, K.S.; BRODINE, S.K.; STRATHDEE, S.A. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 909-916. 2008.

ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; DOMÍNGUEZ, L. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3405-3408. 2006.

SCHURCH, A.C.; KREMER, K.; KIERS, A.; BOEREE, M.J.; SIEZEN, R.J.; SOOLINGEN, D. Preferential deletion events in the direct repeat *locus* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 1318-1322. 2011.

SECHI, L.A.; ZANETTI, S.; SANGUINETTI, M.; MOLICOTTI, P.; ROMANO, L.; LEORI, G.; DELOGU, G.; BOCCIA, S.; LA SORDA, M.; FADDA, G. Molecular basis of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 1645-1648. 2001.

SERRAINO, A.; MARCHETTI, G.; SANGUINETTI, V.; ROSSI, M.C.; ZANONI, R.G.; CATOZZI, L.; BANDERA, A.; DINI, W.; MIGNONE, W.; FRANZETTI, F.; GORI, A. Monitoring transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 2766-2771. 1999.

SUAZO, F.M.; RUIZ, V.B.; CASILLAS, C.R. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 55, n. 2, p. 255-264. 2002.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOJI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4498-4510. 2006.

TELENTI, A. Genetics of drug resistance tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, v.18, n.1, p.55-64. 1997.

THOEN, C.O.; LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A. Tuberculosis in animals and humans, an introduction, p. 3-7. In: Thoen, C.O.; Steele, J.H. & Kaneene, J.B. *Zoonotic Tuberculosis – Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria*. 3rd ed. Willey Blackwell, 2014. 413p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva: 2015.

ZANINI, M.S. Polimorfismo de DNA em *Mycobacterium bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil. 2002. 59p. Thesis – School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, SP, Brazil.

ZHANG, H.; LI, D.; ZHAO, L.; FLEMING, J.; LIN, N.; WANG, T.; LIU, Z.; LI, C.; GALWAY, N.; DENG, J.; ZHOU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; WANG, T.; WANG, S.; HUANG,

Y.; WANG, M.; ZHONG, Q.; ZHOU, L.; CHEN, T.; ZHOU, J.; YANG, R.; ZHU, G.; HANG, H.; ZHANG, J.; LI, F.; WAN, K.; WANG, J.; ZHANG, X.; BI, L. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nature Genetics*, v. 45, n. 10, p. 1255-1262. 2013.

ZUMÁRRAGA, M.; MARTIN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M.E.; ERRICO, F.; RAMO, M.C.; CATALDI, A.; VAN SOOLINGEN, D.; ROMANO, M.I. Usefulness of Spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 296-303. 1999.

5	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
26	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
45	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
48	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
50	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	E1
51	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
72	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
83	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
91	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	49	
8	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1	E	232324253322	Orphan	E2
31	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253322	Orphan	
29	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324243322	Orphan	
59	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324243322	Orphan	
64	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324243322	Orphan	E3
74	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324243322	Orphan	
76	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324243322	Orphan	
11	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232424253322	Orphan	Ungrouped
82	11011111011111011101111111111111110100000	67677367777200	698	BOV_1		232324253321	Orphan	Ungrouped
15	100001110111110111111111111111111100000	41677377777600	982	BOV	Ungrouped	232324263322	Orphan	Ungrouped
28	11011111011111011101111100000011111100000	676773674037600	1021	BOV_1		232324251322	Orphan	Ungrouped
30	11011111011111011101111100000011111100000	676773674037600	1021	BOV_1	F	332314253322	Orphan	Ungrouped
90	11000111011111011111111111111111110100000	61677377777200	1667	BOV_1	Ungrouped	232324253322	49	Ungrouped
18	100110100000111011111111111111111100000	46407377777600	1851	BOV	Ungrouped	232324221222	Orphan	Ungrouped
9	1101111101111101111111000000000111100000	676773770003600	1852	BOV_1		232324253322	49	Ungrouped
10	1101111101111101111111000000000111100000	676773770003600	1852	BOV_1	G	232324251222	Orphan	Ungrouped
27	11011110011111011101111000111111110100000	674773674377200	1853	BOV		232324253322	49	Ungrouped
25	11011110011111011101111000111111110100000	674773674377200	1853	BOV	H	232324253322	Orphan	H1
60	11011110011111011101111000111111110100000	674773674377200	1853	BOV		232324253322	Orphan	
55	110011110111110111011111111111111100000	63677367777600	2141	BOV_1		232324253322	49	Ungrouped
56	110011110111110111011111111111111100000	63677367777600	2141	BOV_1	I	242324263322	Orphan	I1
62	110011110111110111011111111111111100000	63677367777600	2141	BOV_1		242324263322	Orphan	
20	110011110111110111011111011111111100000	63677367677600	Orphan		J	232324253322	49	J1
23	110011110111110111011111011111111100000	63677367677600	Orphan			232324253322	49	
17	110111110111110111011111110000001100000	676773677600600	Orphan	BOV_1	K	232324251322	Orphan	K1
41	110111110111110111011111110000001100000	676773677600600	Orphan	BOV_1		232324251322	Orphan	

Ref.= reference number of the strains
SIT= Spoligotyping International Type
MIRU= Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MIT= MIRU International Type

TABEL 2. Qualitative classification (with respective cut-off points) and minimum inhibitory concentrations (MIC, expressed in µg/mL) for INH and RMP sensibility testing by REMA plate method in *M. bovis* strains isolated from slaughtered bovine lymph nodes. Brazil, 2014 to 2015.

Ref.	Classification		MIC (µg/mL)	
	(0.1µg/mL) INH	(1.0µg/mL) RMP	INH	RMP
4	S	S	< 0,098	< 0,098
5	S	S	< 0,098	< 0,098
6	R	S	>25	0,156
7	S	S	< 0,098	< 0,098
8	R	S	0,246	< 0,098
9	R	S	0,850	< 0,098
10	R	S	0,420	< 0,098
11	R	S	>25	<0,098
12	R	R	>25	3,125
13	S	S	< 0,098	< 0,098
14	S	S	< 0,098	0,185
15	S	S	< 0,098	0,354
16	S	S	< 0,098	0,413
17	R	R	0,296	1,219
18	S	S	< 0,098	0,702
19	S	S	< 0,098	< 0,098
20	S	S	< 0,098	< 0,098
21	S	S	< 0,098	0,562
22	S	S	< 0,098	< 0,098
23	S	S	< 0,098	< 0,098
24	S	S	< 0,098	< 0,098
25	R	R	0,203	1,389
26	S	S	< 0,098	< 0,098
27	S	S	< 0,098	< 0,098
28	R	R	>25	5,624
29	S	R	< 0,098	1,259
30	S	S	< 0,098	< 0,098
31	S	S	< 0,098	< 0,098
39	S	S	< 0,098	< 0,098
41	R	R	>25	3,125
42	S	S	< 0,098	< 0,098
45	S	S	< 0,098	0,141
48	S	S	< 0,098	0,150
50	S	S	< 0,098	0,419
81	S	S	< 0,098	< 0,098
51	R	R	>25	3,125

Ref.	Classification		MIC (µg/mL)	
	(0.1µg/mL) INH	(1.0µg/mL) RMP	INH	RMP
52	S	S	< 0,098	< 0,098
53	S	S	< 0,098	< 0,098
55	S	S	< 0,098	< 0,098
56	S	S	< 0,098	< 0,098
57	S	S	< 0,098	< 0,098
59	S	S	< 0,098	< 0,098
60	S	S	< 0,098	< 0,098
62	S	S	< 0,098	0,171
63	R	S	0,194	< 0,098
64	S	S	< 0,098	< 0,098
66	S	S	< 0,098	0,117
67	R	S	0,156	< 0,098
69	S	S	< 0,098	< 0,098
72	S	S	< 0,098	< 0,098
73	R	R	6,25	>25
74	S	S	< 0,098	0,164
76	S	S	< 0,098	< 0,098
77	R	R	>25	3,125
78	S	S	< 0,098	< 0,098
79	R	R	>25	3,125
82	R	R	>25	3,125
83	S	S	< 0,098	< 0,098
84	S	S	< 0,098	< 0,098
85	R	S	0,120	0,099
86	S	S	< 0,098	< 0,098
88	S	S	< 0,098	< 0,098
90	S	R	< 0,098	2,759
91	R	R	>25	5,771
93	S	S	< 0,098	< 0,098
96	S	S	< 0,098	0,727
97	S	S	< 0,098	< 0,098

Ref.= reference number of the strains

INH= isoniazid

RMP= rifampicin

MIC= Minimal Inhibitory Concentration

S= sensible

R= resistant

