

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DO ESTADO DE SÃO PAULO BRASIL, UTILIZANDO A TÉCNICA DE *SPOLIGOTYPING*

**C.A.R. Rodriguez^{1*}, M.J. Zumárraga², E.M. de D. Oliveira¹, A.A. Cataldi²,
M.I. Romano², H.H. Otto³, V.L. Bonafé³, J.S. Ferreira Neto¹**

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Rua Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: pancho@usp.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar, pela técnica de *Spoligotyping*, 43 isolados de *Mycobacterium bovis*, provenientes de bovinos abatidos no Estado de São Paulo, em 12 diferentes espilogotipos. Destes isolados 35 foram classificados em 6 espilogotipos já conhecidos (SB0295, SB0121, SB0140, SB0120, AR28 e SB0122) e os outros 8 em 6 novos espilogotipos. Vinte e nove amostras foram classificadas nos espilogotipos SB0295, SB0121 e SB0140, sendo o espilogotipo SB0140 majoritário na Argentina e presente no Paraguai e Uruguai. O espilogotipo SB0120 é o mais freqüente na França (26%), tendo sido encontrado na Bélgica, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Sri Lanka e Holanda. O espilogotipo AR28, já foi encontrado na Argentina e no Brasil. O espilogotipo SB0122 foi referido apenas na Holanda. Dos novos espilogotipos encontrados no presente estudo, é importante ressaltar, que até o momento 6 deles são espilogotipos únicos, dois isolados como espilogotipo N7 e dois isolados como espilogotipo N8. Estes resultados mostram que existem no Brasil espilogotipos que parecem, até o momento, ser compartilhados entre Brasil, Argentina e Europa. Sendo assim a discriminação molecular de isolados de *M. bovis* através do *Spoligotyping* constitui-se numa ferramenta para sistemas de vigilância na detecção de focos de tuberculose bovina.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium bovis*, *Spoligotyping*, espilogotipos, caracterização molecular, tuberculose bovina, sistemas de vigilância.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* ISOLATES FROM THE STATE OF SÃO PAULO, BY THE USE OF THE *SPOLIGOTYPING* TECHNIQUE. This goal of this research was to study, by *Spoligotyping*, 43 *Mycobacterium bovis* isolates, from cattle slaughtered in the State of São Paulo, typed in 12 different spoligotypes. Among these isolates 35 were classified in 6 spoligotypes known already, and 8 isolates in 6 new spoligotypes. Within those, 29 isolates corresponded to the SB0295, SB0121 and SB0140 spoligotypes. The SB0140 spoligotype is the major type found in Argentina and is also present in Paraguay and Uruguay. The SB0120 spoligotype is the most frequently observed type in France (26%) and has also been found in Belgium, China, Denmark, Iran, Japan, Portugal, Russia, South Africa, Sri Lanka and the Netherlands. The AR28 spoligotype has also been found in Argentina and Brazil. SB0122 was only cited in the Netherlands. It is important to emphasize that among the new spoligotypes found in the present study, at the moment, there are 6 unique spoligotypes, 2 of them isolated as N7 spoligotype and 2 isolated as the N8 spoligotype. The results show that there are in Brazil spoligotypes that, up to this moment, seem to be shared between Brazil, Argentina and Europe, and therefore the molecular discrimination of the *M. bovis* isolates by the *Spoligotyping* constitutes a tool for surveillance systems in detecting focuses of bovine tuberculosis.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, *Spoligotyping*, molecular characterization, bovine tuberculosis, surveillance systems.

²Instituto de Biotecnología, CICV/INTA. Castelar, Argentina.

³Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença zoonótica, causada pelo *Mycobacterium bovis* cujo principal hospedeiro é o rebanho bovino. Diversas espécies de mamíferos inclusive o homem podem infectar-se pelo bacilo. Além do risco à saúde pública, existem as perdas econômicas em consequência à diminuição de produtividade nos rebanhos acometidos (ACHA & ZYFRES, 2001; NADER & HUSBERG, 1988 *apud* KANTOR & RITACCO, 1994) e a desvalorização dos produtos de origem animal no mercado internacional (KANTOR & ÁLVARES, 1991).

No Brasil, testes de tuberculinização realizados em 1989, em quatro regiões do país, revelaram níveis de infecção situados entre 0,9 e 2,9%, com 6,2 a 26,3% dos rebanhos contendo animais reatores (KANTOR & RITACCO, 1994). Estudo realizado em 1999, em 7 regiões do Estado de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram detectadas 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu a 15% no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BELCHIOR, 2000).

Programas de erradicação baseados em testes de tuberculinização com posterior abate dos animais reatores, têm obtido diversos resultados em vários países como na União Européia, onde a situação sanitária não é homogênea e existem: países que erradicaram a doença (Dinamarca, Holanda e Luxemburgo), países nos quais a prevalência da doença é extremamente pequena (Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França, Grécia e Portugal) e outros onde a doença ainda não está suficientemente controlada (Itália, Irlanda e Espanha). Nestes programas, aos métodos diretos de diagnóstico é reservada uma função estratégica e de apoio às ações de vigilância, tradicionalmente desenvolvidas nas fases de erradicação ou de baixa prevalência de focos.

Quanto aos métodos diretos de diagnóstico, a visualização de micobactérias através da coloração de Ziehl-Neelsen, a despeito de ser rápido e barato, só consegue revelar a presença de bacilo álcool-ácido resistente em concentrações superiores a 10^4 bactérias por mL. Esta técnica não permite distinguir membros da família Mycobacteriaceae (BARKSDALE & KIM, 1977), e outros microorganismo, tais como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, que apresentam as mesmas características tintoriais (PRITCHARD, 1998). As técnicas microbiológicas clássicas empregadas para isolamentos de micobactérias revelam baixa sensibilidade, pois há perdas consideráveis nos processos de descontaminação, além do consumo de várias semanas entre o isolamento primário e a identificação

final da espécie (CORNER *et al.*, 1994). Embora resultados promissores tenham sido descritos com a aplicação na reação da cadeia da polimerase (PCR) diretamente da lesão (SAKAMOTO *et al.*, 1999; ZUMARRAGA *et al.*, 2001) ainda não é possível prescindir do isolamento através das técnicas clássicas para fins diagnósticos.

Uma combinação que tem se mostrado eficiente para o diagnóstico direto da tuberculose bovina é o isolamento através de bacteriologia clássica, seguido da identificação por métodos moleculares PRA-PCR (TELENTI *et al.*, 1993); *Spoligotyping* – (KAMERBEEK *et al.*, 1997) e (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1995); MIRU-VNTR (SUPPLY *et al.*, 2000). Além de identificar a espécie, as técnicas de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR permitem discriminar isolados de *M. bovis*.

Através do *Spoligotyping* podemos tipificar estirpe de *M. bovis* por meio da presença ou ausência dos espaçadores de sequência conhecida (KAMERBEEK *et al.*, 1997 e VAN SOOLINGEN *et al.*, 1995). O primeiro passo no método é amplificar a região de repetição direta — Direct Repeat (DR) da cepa em estudo por PCR. Os *primers* usados são baseados na sequência do DR e permite a amplificação dos espaçadores entre as DR's. O produto de PCR obtido difere em tamanho por duas razões: primeiro, os amplificados contêm muitos espaçadores com suas DR's se os oligonucleotídeos iniciadores ligarem em DR's não imediatamente vizinhos; segundo, os amplificados em cada ciclo funcionam eles mesmos como *primers* e se tornam alongados com uma ou mais DVR's.

Assim, o *Spoligotyping* possibilita a detecção e a tipificação simultâneas de micobactérias do Complexo tuberculosus (KAMERBEEK *et al.*, 1997), e é indicada como técnica de eleição para a comparação de estirpe com poucas cópias de IS 6110. Outra vantagem é a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pela ausência e presença, respectivamente, dos espaçadores 39 ao 43. Novos espaçadores estão sendo estudados para tentar melhorar seu polimorfismo.

A partir do final da década de 1990, sugeriram os primeiros estudos com isolados de *M. bovis* de várias partes do mundo através dessas técnicas. Zumarraga *et al.* (1999a) e HADDAD *et al.* (2001) descreveram o espoligotipo SB0140 como majoritário na Argentina e também presente nos países limítrofes como Paraguai e Uruguai. HADDAD *et al.* (2001); e ARANAZ *et al.* (1996) descreveram os espoligotipos SB0140, SB0295, SB0121 e SB0122 na Inglaterra, Bélgica, Holanda e França. O padrão SB0120, também denominado BCG like, representa 26% das estirpes da França e já foi detectado em diversos outros países como Bélgica, Brasil, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Sri Lanka, Holanda, mas não são encontrados na Inglaterra e Irlanda (HADDAD *et al.*, 2001; ARANAZ *et al.*, 1996; VAN EMBDEN *et al.*, 2000; KREMER *et al.*, 1999).

O objetivo do presente trabalho foi estudar, pela técnica de *Spoligotyping*, 43 isolados de *M. bovis*, provenientes de bovinos abatidos no Estado de São Paulo e que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose durante a inspeção de carnes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lesões sugestivas de tuberculose bovina foram colhidas em abatedouros do Estado de São Paulo, durante o período de agosto de 2002 à março de 2003. Essas lesões foram acondicionadas em frascos plásticos contendo solução saturada de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 140 g/L) (RICHARDS & WRIGHT, 1983; HERNÁNDEZ DE HANDA *et al.*, 1997). Essas amostras foram transportadas para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram processadas no prazo máximo de 60 dias para a tentativa de isolamento de micobactérias, conforme descrito pelos métodos de laboratório de

micobacteriologia veterinária para o isolamento e identificação de micobactérias (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973). Dos isolados caracterizados como BAAR foi extraído o DNA para a realização da técnica de *Spoligotyping* (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Os padrões polimórficos foram comparados com banco de dados internacional, disponível na literatura (ZUMARRAGA *et al.*, 1999a; HADDAD *et al.*, 2001; ARANAZ *et al.*, 1996; VAN EMBDEN *et al.*, 2000; KREMER *et al.*, 1999.) A nomenclatura adotada para os espoligotipos encontrados foi a mesma que encontra-se disponível no site www.mbovis.org. Os novos espoligotipos encontrados foram nomeados pelos autores.

Com o apoio da Coordenadoria de Defesa Agropecuária, foi realizado o rastreamento das propriedades de origem dos animais infectados.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão organizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Perfil dos espoligotipos encontrados. São Paulo, 2004.

Espoligotipo segundo www.mbovis.org	Espécie	Perfil do espoligotipo
SB0140	<i>M. bovis</i>	11011010000011101111111111111111111100000
SB0121	<i>M. bovis</i>	11011111011111101111101111111111111100000
SB0120	<i>M. bovis</i>	11011111011111101111111111111111111100000
SB 0295	<i>M. bovis</i>	1101111101111110111110111111111111110100000
SB0122	<i>M. bovis</i>	010111110111111011111011111111111111100000
Ar 28*	<i>M. bovis</i>	110111110111100000110111111111111111100000
N 7**	<i>M. bovis</i>	000000000001111011111111111111111111100000
N 8**	<i>M. bovis</i>	110111110111111011111111000000000111100000
N 9**	<i>M. bovis</i>	110111110111111011111010111111111111100000
N 10**	<i>M. bovis</i>	1101111001111110111110111111111111110100000
N 11**	<i>M. bovis</i>	1101111101111110111110111111011111110100000
N 17**	<i>M. bovis</i>	11011111011111101111101111000000111111000000

*Espoligotipo ausente do site www.mbovis.org, mas já descrito por ZUMARRAGA *et al.*, 1999b.

**Novos espoligotipos encontrados e que foram nomeados pelos autores.

Tabela 2 - Espoligotipos, segundo o número de isolados e a procedência. São Paulo, 2004.

Espoligotipo segundo www.mbovis.org	Número de isolados	Município de procedência do animal ou do abatedouro*
SB0295	2	Birigui
SB0295	1	Descalvado
SB0295	1	Franca*
SB0295	1	Monte Aprazível
SB0295	1	Jose Bonifácio
SB0295	1	João Ramalho
SB0295	1	Macaubal
SB0295	1	Rinópolis
SB0295	1	Salmourão

Tabela 2 - Continuação.

Espoligotipo segundo www.mbovis.org	Número de isolados	Município de procedência do animal ou do abatedouro*
SB0295	1	Votuporanga
SB0121	1	Álvares Florence
SB0121	1	Assis
SB0121	1	Barbosa
SB0121	1	Coroados
SB0121	1	Ipigúá
SB0121	3	Franca
SB0121	1	Monte alto
SB0121	1	Palestina
SB0121	1	Promissão
SB0140	1	Bebedouro
SB0140	2	Conchas*
SB0140	1	Echaporã
SB0140	1	Luiziânia
SB0140	1	Penápolis
SB0140	1	Viradouro
Ar 28*	1	Assis
Ar 28*	1	Santa Albertina
BCG SB0120	1	Monte Azul Paulista
BCG SB0120	1	Guarani do O'este
SB0122	1	Ipigúá
SB0122	1	Santa Adelina
N 7 **	1	Sorocaba*
N 7**	1	Cosmorama
N 8**	1	Mogi Mirim*
N 8**	1	Santa Adelina
N 9**	1	Sorocaba
N 10**	1	Cosmorama
N 11**	1	Assis*
N 17**	1	Pirapozinho

*Espoligotipo ausente do site www.mbovis.org, mas já descrito por ZUMARRAGA *et al.*, 1999b.

**Novos espoligotipos encontrados e a serem descritas com nomenclatura sugerida pelos autores.

DISCUSSÃO

Dos 43 isolados de *M. bovis* estudados pelo *Spoligotyping*, foram encontrados 12 diferentes espoligotipos (Tabela 1). Trinta e cinco foram classificados em 6 espoligotipos já conhecidos e descritos pela literatura internacional. Os outros 8 isolados foram classificados em 6 novos espoligotipos, ainda não descritos.

Vinte e nove isolados (67% dos *M. bovis* aqui estudados), foram classificados nos espoligotipos SB0295 (25,6%), SB0121 (25,6%) e SB0140 (16%). Zumarraga *et al.* (1999b) descreveram o espoligotipo SB0140 como majoritário na Argentina e também presente no Paraguai e Uruguai e, apesar de terem estudado 23 isolados brasileiros, inclusive do Estado de São Paulo, não referiram a presença deste espoligotipo no Brasil. Os espoligotipos SB0295 e

SB0121, que se mostraram majoritários no presente estudo, ainda não foram descritos em países da América Latina, exceto no Brasil (ZUMARRAGA *et al.*, 1999a) - SB0121; (ZANINI *et al.*, 2001) - SB0295). HADDAD *et al.* (2001) descreveram o SB0295 na Holanda e o SB0121 na Bélgica.

O espoligotipo SB0120 (4,6% dos isolados) é o mais freqüente na França (26%) e também já foi encontrado na Bélgica, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha, Sri Lanka e Holanda. Não foi detectado na Inglaterra e Irlanda (HADDAD *et al.*, 2001; ARANAZ *et al.*, 1996; VAN EMBDEN *et al.*, 2000; KREMER *et al.*, 1999).

O espoligotipo AR28 (4,6% dos isolados), já foi encontrado na Argentina e no Brasil (ZUMARRAGA *et al.*, 1999b).

O espoligotipo SB0122 (4,6%) foi referido apenas na Holanda (www.mbovis.org).

Relativamente aos novos espilogotipos encontrados no presente estudo, importante ressaltar que até o momento 6 deles são espilogotipos únicos, 2 isolados foram classificados provisoriamente como espilogotipo N7 (isolados de animais de diferentes propriedades) e 2 isolados no espilogotipo N8 (provenientes de animais localizados em municípios diferentes).

Estes resultados mostram que existem no Brasil espilogotipos que parecem, até o momento, ser compartilhados entre Brasil, Argentina e Europa (SB0140 e AR28) e exclusivamente pelo Brasil e Europa (SB0295, SB0121, SB0120 e SB0122), demonstrando relações epidemiológicas entre o Brasil e estas duas regiões.

A discriminação molecular de isolados de *M. bovis* através do *Spoligotyping* é uma técnica nova, sofisticada, mas não apresenta grandes dificuldades na sua realização. Constitui-se numa ferramenta valiosa para dar apoio e racionalidade aos sistemas de vigilância para detecção de focos de tuberculose bovina, sistema este de grande importância para as áreas de baixa prevalência de focos, como parece ser grande parte do território brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales*. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. p.266-283.
- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZÁLEZ, O.; RODRÍGUEZ-FERRI, E.F.; VAN EMBDEN, J.D.A.; COUSINS, D.V. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.2734-2740, 1996.
- BARKSDALE, L. & KIM, K. *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.*, v.41, p.217-372, 1997.
- BELCHIOR, A.P.C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. Belo Horizonte: 2000. 55p. [Dissertação (mestrado) – Escola de Veterinária, Univ. Fed. Minas Gerais].
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Metodos de laboratorio de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identificacion de micobacterias*. Buenos Aires, 1973. 48p. (Série de monografias científicas y técnicas, 6)
- CILLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet. Microbiol.*, v. 40, n.1-2, p.83-94, 1994.
- CORNER, D.M.; JHN, M.; BUNDESEN, P.G.; WOOD, P.R. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.*, v.18, p.191-196, 1988.
- CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.
- HADDAD, N.; OSTYN, A.; KAROUI, C.; MASSELOT, M.; THOREL, M.F.; HUGHES, S.L.; INWALD, J.; HEWINSON, R.G.; DURAND, B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.3623-3632, 2001.
- HERNANDEZ DE ANDA, J.; EVANGELISTA, T.R.; VALENCIA, G.L.; HODGERS, M.M. Na abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, Mexico. *J. Am Vet Med Assoc.*, v.211, n.6, p.709-711, 1997. * errata no v.211, n.12, p.1576, 1997.
- KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, 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. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.4, p.907-14, 1997.
- KANTOR, I.N. & RITACCO, V. *Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs*. *Vet. Microbiol.*, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.
- KANTOR, I.N. & ÁLVAREZ, E. *Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean*. Martines, Argentina: Pan American Zoonoses Center, 1991. 48p. (Special Publication n.10)
- KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P.W.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B.B.; RILEY, L.W.; YAKRUS, M.A.; MUSSER, J.M.; VAN EMBDEN, J.D. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.2607-2618, 1999.
- PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J. Comp. Pathol.*, v.99, p.357-399, 1998.
- RICHARDS, W.D. & WRIGHT, H.S. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, v.17, n.3, p.393-395, 1983.
- ROBERTS, M.C.; McMILLAN, C.; COYLE, M.B. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* Complex. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, n.7, p.1239-1243, 1987.
- SAKAMOTO, S.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, M.A.S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA NETO, J. S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação da cadeia da polimerase (PCR). *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.66, n.2, p.45-58, 1999.
- SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, v.36, n.3, p.762-771, 2000.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.2, p.175-8, 1993.
- VAN EMBDEN, J.D.; VAN GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; VAN DER ZEIJST, B.A.; SCHOOLS, L.M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.*, v.182, p.2393-2401, 2000.

- VAN SOOLINGEN, D.; QUIAN, L.; DE HAAS, P.E.W.; DOUGLAS, J.T.; TRAORE, H.; PORTAELS, F.; QUINA, H.Z.I.; ENKHSaikan, D.; NYMADAWA, P.; VAN EMBDEN J.D.A. Predominant of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.3234-3238, 1995.
- ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C. FIORAVANTI, R.I.; ROXO, E.; ZUMÁRRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by *Spoligotyping* and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.809-813, 2001.
- ZUMÁRRAGA, M.; CICUTA, M.E.; MARTÍN, C.; CATALDI, A.; ALITO, A.; BIGI, F.; ROXO, E.; SAKAMOTO, S.; ROMANO, M.I. Epidemiología molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* del Nordeste Argentino y de Brasil utilizando la técnica de *Spoligotyping*. Comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional de Nordeste, 1999a
- ZUMÁRRAGA, M.; MARTÍN, 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. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n. 2, p.296-303, 1999b
- ZUMÁRRAGA, M.J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO, S.; GIOFFRÉ, A.; CATALDI, A. Aplicación de la PCR en la detección *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros. *Vet. Arg.* v.18, n.179, p.668-677, 2001.

Recebido em 5/7/04

Aceito em 4/9/04