

Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos¹

Fernando Alzamora Filho^{2*}, Sidra E.G. Vasconcellos³, Harrison M. Gomes³, Miriam P. Cavalcante⁴, Philip N. Suffys³ e Joselito N. Costa⁵

ABSTRACT.- Alzamora Filho F., Vasconcellos S.E.G., Gomes H.M., Cavalcante M.P., Suffys P.N. & Costa J.N. 2014. [**Multiple strains of *Mycobacterium bovis* isolates identified by molecular typing of bovine animals slaughtered in slaughterhouse.**] Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(2):103-108. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado Km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil. E-mail: alzafilho@yahoo.com.br

The aim of this study was to use bacteriological and molecular methods to identify *Mycobacterium bovis* in lesions observed in cattle carcasses during routine *post-mortem* inspection in slaughterhouses with official inspection service. It was accompanied the slaughter and inspection of 825,394 cattle, healthy *ante mortem* examination by the official inspection service in ten slaughterhouses in the state of Bahia. Carcasses of 180 cattle presented lesions suggestive of tuberculosis and other lymphadenitis. In bacterial isolation, 25 samples showed dysgonic growth of colonies of creamy-yellow in medium-Stonebrink Leslie. From these isolates, 14 were identified as *M. bovis* and the multiplex PCR technique spoligotyping was discriminated against eight different spoligotypes of *M. bovis*, seven previously described in the literature and a new spoligotypes without former description. The major spoligotypes was SB0121, with five samples which has been described in Brazil and other countries, followed by two clusters, SB295 and SB1055, with two isolates each. The SB1145 and SB1648 spoligotypes were reported only in Brazil and Denmark, respectively. The spoligotypes SB140 has been found in Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay. These results demonstrate that the spoligotypes obtained are shared, so far, among Brazilian states and among Latin America and Europe. Thus, molecular discrimination of isolates of *M. bovis* by Spoligotyping constitutes a tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis in the state of Bahia.

INDEX TERMS: *Mycobacterium bovis*, mycobacteria, molecular epidemiology, spoligotyping, tuberculosis, zoonosis, cattle.

¹ Recebido em 4 de setembro de 2013.

Aceito para publicação em 22 de outubro de 2013.

² Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Pavilhão Jorge Amado, Rodovia Jorge Amado Km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brasil. *Autor para correspondência: alzafilho@yahoo.com.br

³ Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil.

⁵ Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB), Rua Rui Barbosa 710, Campus Universitário, Cruz das Almas, BA 44380-000, Brasil.

RESUMO.- O objetivo do presente trabalho foi utilizar métodos bacteriológicos e moleculares para a identificação do *Mycobacterium bovis* em lesões observadas em carcaças de bovinos durante a inspeção *post mortem* de rotina em matadouros-frigoríficos com serviço de inspeção oficial. Foi acompanhado o abate e a inspeção de 825.394 bovinos, sadios ao exame *ante mortem* pelo serviço de inspeção oficial em dez matadouros-frigoríficos do estado da Bahia. Carcaça de 180 bovinos apresentaram lesões sugestivas de tuberculose e por outras linfadenites. No isolamento bacteriano, 25 amostras apresentaram crescimento disgônico de colônias de coloração creme-amareladas em meio de cultura Stonebrink-Leslie. Desses isolados, 14 foram identifi-

cados como *M. bovis* PCR *multiplex* e pela técnica do *spoligotyping* foram discriminados oito diferentes espoligotipos do *M. bovis*, sendo sete descritos na literatura e um novo espoligotipo sem descrição anterior. O espoligotipo majoritário foi o SB0121, com cinco amostras, sendo descrito no Brasil e em outros países, seguidos por dois *clusters*, SB295 e SB1055, com dois isolados cada. O espoligotipo SB1145 e SB1648 foram referidos apenas no Brasil e Dinamarca, respectivamente. O espoligotipo SB140 já foi encontrado no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Estes resultados demonstram que os espoligotipos obtidos são compartilhados, até o momento, entre estados brasileiros e entre países da América Latina e Europa. Sendo assim, a discriminação molecular de isolados de *M. bovis* através do *Spoligotyping* constitui-se numa ferramenta para estudos epidemiológicos da tuberculose bovina no Estado da Bahia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Mycobacterium bovis*, micobactéria, epidemiologia molecular, *spoligotyping*, tuberculose, zoonose, bovinos.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas nodulares denominadas tubérculos, que podem estar localizados em qualquer órgão, mas com distribuição predominante no trato respiratório e nos gânglios linfáticos bronquiais e mediastínicos e ocasionalmente nos intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (Brasil 2006, Heinemann et al. 2008).

A tuberculose no homem é causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, mas a doença causada por *M. bovis* tem sido reportada e representa um risco para a saúde pública (Parreiras et al. 2012, Reyes et al. 2012). Em 2011, 8,7 milhões de pessoas adoeceram e 1,4 milhões de óbitos anuais foi determinado pela tuberculose. A maioria dos óbitos ocorre em países de baixa e média renda e está entre as três principais causas de mortes em mulheres entre 15 e 44 anos de idade (WHO 2012).

A importância econômica atribuída à doença bovina está baseada nas perdas diretas resultantes da morte de animais, redução no ganho de peso, diminuição na produção de leite e descarte precoce de animais de elevado valor zootécnico (Lilenbaum 2000, Pacheco et al. 2009).

A pecuária tem se expandido significativamente nas últimas décadas, representando um importante setor na economia do Brasil e o rebanho bovino da Bahia, 10.528.419 cabeças, o equivalente a 36,6% do efetivo do Nordeste, contribui para a crescente importância do agronegócio no Estado (IBGE 2010). Esse crescimento torna cada vez mais necessário o incremento do controle sanitário nos rebanhos. No Brasil, a tuberculose bovina é endêmica e acomete grande parte das propriedades de leite, devido ao fato dos animais serem submetidos ao confinamento; dados de notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais reagentes à tuberculina no período de 1989-1998. Com o intuito de diminuir a ocorrência da doença nos rebanhos bovinos, o MAPA instituiu em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelo-

se e Tuberculose Bovina (PNCEBT), que tem o objetivo de reduzir a prevalência e incidência da doença (Brasil 2006).

O inquérito epidemiológico da tuberculose no Estado da Bahia, realizado entre 2008 e 2010, revelou uma prevalência de foco de Tuberculose bovina e de animais reagentes à tuberculina com idade maior ou igual a 24 meses de 1,6% e 0,21%, respectivamente (Costa 2012). Segundo Araújo (2004), estudos realizados no país, a partir de exames de carcaças em matadouros-frigoríficos, estimaram uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais, 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul. Esta diferença está relacionada ao grau de desenvolvimento regional, principalmente no que se refere ao estabelecimento de medidas sanitárias no rebanho.

A inspeção *post mortem* dos animais destinados ao consumo nos abatedouros tem grande importância na vigilância epidemiológica da tuberculose e, por meio desta medida, países endêmicos que possuem satisfatório desempenho nos seus serviços de inspeção nos abatedouros, juntamente com um consolidado programa de erradicação, têm conseguido reduzir a prevalência da doença (De La Rua-Domenech 2006, Kantor & Ritacco 2006). A identificação de alterações anatomopatológicas características durante a inspeção *post mortem* nos matadouros-frigoríficos, juntamente com a realização dos métodos diretos de diagnóstico da tuberculose são importantes ferramentas na vigilância epidemiológica da doença (Biffa et al. 2010).

Diversos estudos vêm demonstrando a possibilidade do uso da PCR no diagnóstico da tuberculose bovina, permitindo uma maior acurácia e significativa redução do tempo do diagnóstico em relação aos métodos tradicionais de identificação dos isolados (Zanini et al. 2001, Cardoso et al. 2009, Collins 2011). Estudos epidemiológicos moleculares da tuberculose bovina têm sido utilizados para monitoramento e controle do comércio de animais, bem como para a investigação da origem da infecção (Figueiredo et al. 2011).

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. Uma técnica que vem sendo utilizada é o *spoligotyping*, que se baseia no polimorfismo de DNA presente em um locus cromossomal particular, a região de repetição direta (DR), presente apenas nas bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Sendo indicada como técnica de eleição para a comparação de estirpes com poucas cópias de IS 6110, além da diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pela ausência e presença, respectivamente, dos espaçadores 39 aos 43 (Kamerbeek et al. 1997, Rodriguez et al. 2004, McLernon et al. 2011). O *spoligotyping*, método rápido e de baixo custo para tipificação e tem sido utilizado com sucesso em alguns estudos com cepas de *M. bovis* isoladas no Brasil. Também tem demonstrado ser uma metodologia útil para a compreensão da epidemiologia do *M. bovis* em vários países (Haddad et al. 2004, Rodriguez et al. 2004, Collins 2011, Parreiras et al. 2012, Reyes et al. 2012).

A genotipagem do *M. bovis* tem contribuído para um melhor conhecimento da transmissão da tuberculose bovina ou mesmo da compreensão epidemiológica da infecção, que são fundamentais para melhorar na gestão eficaz dos

sistemas de controle dessa enfermidade (Costa et al. 2010, Figueiredo et al. 2011, McLernon et al. 2011). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética, pela técnica de *Spoligotyping*, de 14 isolados de *M. bovis* provenientes de bovinos abatidos no Estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de abril de 2009 a abril de 2012, foi acompanhado o abate e a inspeção *post mortem* de 825.394 bovinos, sadios ao exame *ante mortem* pelo serviço de inspeção oficial abatidos em 10 matadouros-frigoríficos com serviço de inspeção oficial, localizados em 10 municípios do Estado da Bahia. As lesões sugestivas de tuberculose ou por linfadenites diversas durante a rotina de inspeção das carcaças bovinas foram acondicionadas em frascos com solução saturada de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 140g/L), como meio conservante, o qual preserva as micobactérias por até 60 dias em temperatura ambiente (Richards & Wright 1983, Rodriguez et al. 2004). Dados referentes à procedência dos animais foram obtidos por meio da Guia de Trânsito Animal (GTA). As amostras foram enviadas para o laboratório de Tuberculose da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia e foram processadas no prazo máximo de 60 dias para a tentativa de isolamento e identificação de micobactérias. Essas foram descontaminadas pelo cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC), inoculadas nos meios de cultura Stonebrink-leslie e Lowenstein-Jensen, incubadas a 37°C por até 90 dias e avaliados semanalmente para verificação de colônias sugestivas de micobactérias. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen para confirmação das características tintoriais de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Brasil 2008).

Dos isolados BAAR, foi extraído o DNA por lise térmica a 100 °C por 30 min. e confirmou-se a identificação de *Mycobacterium bovis* por PCR multiplex (Warren et al. 2006). A tipificação molecular pelo *Spoligotyping* foi realizada como o descrito por Kamerbeek et al. (1997). A amplificação da região direta foi realizada num volume final de 50µL com 0,2mM contendo dNTP (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 20pmol de primers para cada iniciador (Dra biotilado e DRb) e 1 U de Taq DNA polimerase e 10ng de DNA. A PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 96°C

por 3 min., 20 ciclos de amplificação a 96°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 30 s, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 min. O DNA de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* Moureau H37Rv foram utilizados como controles positivos e água ultra-pura foi o controle negativo. Os produtos de PCR foram hibridados em membrana contendo 43 oligonucleotídeos de sequências espaçadoras conhecidas. Após incubação com estreptavidina-peroxidase, os espaçadores foram detectados por quimioluminescência. Os padrões polimórficos foram comparados com banco de dados internacional, disponível na literatura (Kremer et al. 1999, Van Embden et al. 2000, Haddad et al. 2001). A nomenclatura adotada para os spoligotipos obtidos foi a mesma que encontra-se disponível no site www.mbovis.org. O novo spoligotipo determinado foi nomeado pelos autores.

RESULTADOS

Do total de 825.394 bovinos abatidos durante a rotina de inspeção em 10 matadouros-frigoríficos, 180 carcaças (0,02%) apresentaram nódulos de aspecto caseoso sugestivo de tuberculose (Fig.1) ou por linfadenites por outras causas. As lesões estavam localizadas principalmente em linfonodos da cabeça e pescoço, assim como nos linfonodos torácicos, pulmões, fígado e peritônio.

Na bacteriologia, o crescimento de colônias de coloração creme-amareladas, pequenas, arredondadas, bordas irregulares, superfície granular em meio de cultura Stonebrink-Leslie foi observado em 25 (13,9%) amostras das 180 provenientes de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos no Estado da Bahia. O tempo médio observado para o aparecimento das colônias foi de 34 dias, sendo o mínimo de 22 dias e o máximo de 63 dias. Foram submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen e todos os esfregaços evidenciaram a presença de bacilos álcool-ácido resistentes. Pela PCR múltipla, *Mycobacterium bovis* foi identificado em 14/25 (56%) isolados. Nas demais amostras, 11/25 (44%) não apresentaram amplificações das regiões genômicas que caracterizam o complexo *M. tuberculosis*.

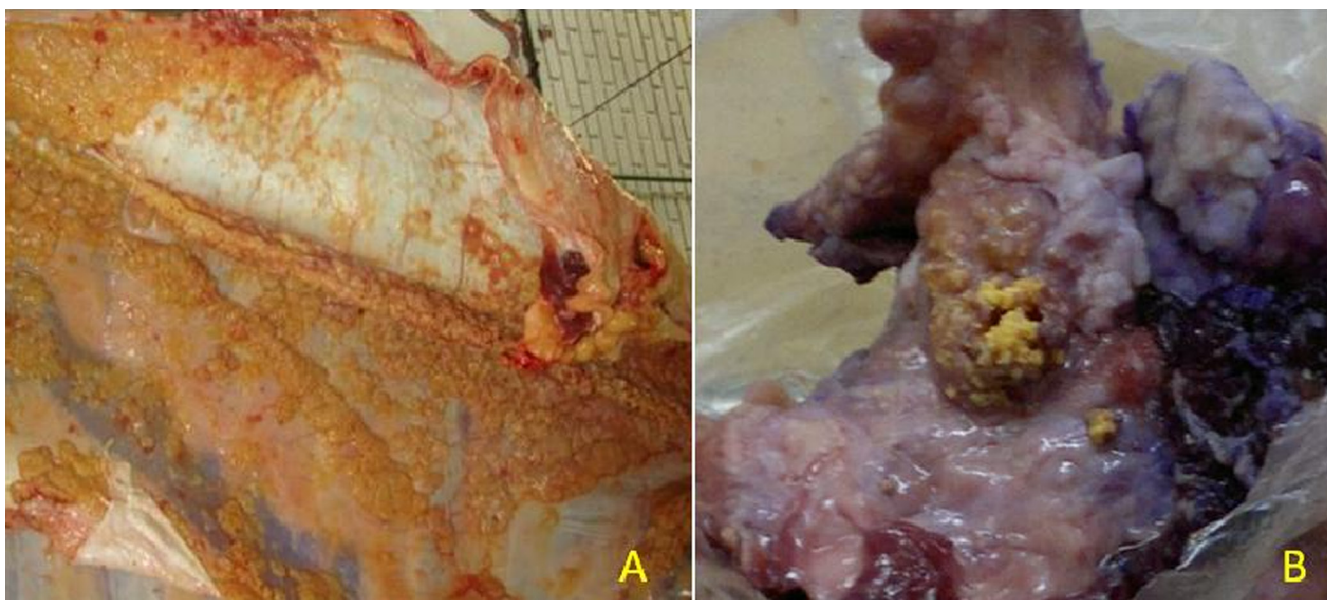


Fig.1. (A) Carcaça bovina condenada com lesões sugestivas de tuberculose bovina. (B) Pulmão com nódulos de aspecto caseoso.

buição na América Latina, com registros no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, México e Costa Rica (Costa et al. 2010, Parreiras et al. 2012).

O perfil SB1145 foi isolado em uma amostra proveniente de Alagoinhas-BA, sendo referido apenas no Brasil. Rodriguez (2005) identificou o espoligotipo em bovinos abatidos em São Paulo e em Minas Gerais, Parreiras et al. (2012) isolaram o SB1145 em 3,3% (2/61) dos bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos.

O SB0140 está presente em bovinos abatidos na Bahia e está amplamente difundido pela América latina, sendo identificado na Argentina, Paraguai, Uruguai e México (Haddad et al. 2001, Reyes et al. 2012, Zumárraga et al. 2012). Esse perfil também foi descrito na Austrália, Bélgica, França, Holanda, Irlanda, Reino Unido e África do Sul (www.mbovis.org). Na Itália, Boniotti et al. (2009) observaram uma baixa porcentagem do perfil, com 0,4% dos isolados. Gibson et al. (2004) relataram 15 casos de tuberculose humana no Reino Unido, no período de 1997 a 2000, foi devido ao perfil SB0140. Rodriguez et al. (2004) observaram uma frequência de 16% dos isolados em bovinos abatidos em São Paulo.

O espoligotipo SB828 foi identificado em uma amostra, enquanto Boniotti et al. (2009), na Itália, relataram o espoligotipo em seis amostras. Também foi relatado na França e Espanha (www.mbovis.org). O espoligotipo SB1648 (7,2%) foi referido apenas na Dinamarca (www.mbovis.org) e no presente estudo, um novo espoligotipo obtido foi classificado provisoriamente como espoligotipo EG-BA12.

Esses resultados demonstram que na Bahia existem compartilhamento de espoligotipos (SB295, SB121, SB1055, SB1145 e SB140) com outros estados brasileiros, São Paulo e Minas Gerais, como em outros Países como Argentina, México, Inglaterra, Espanha, Portugal e França. Enquanto que outros perfis (SB1648 e SB828) não foram relatados ainda no Brasil, mas foram discriminados na Europa.

A tipificação genética de isolados de *M. bovis* é uma técnica valorosa para a investigação epidemiológica, permitindo compreender a atuação dos reservatórios silvestres, identificação das regiões com perfis semelhantes de espoligotipos e na detecção dos focos de tuberculose bovina, principalmente em áreas de baixa prevalência (Rodriguez et al., 2004, Collins 2011). Essa diversidade genética dos isolados de *M. bovis* provenientes de carcaças de bovinos na Bahia sugere que a movimentação de animais entre propriedades, regiões ou países é um importante fator para a transmissão da tuberculose bovina. Segundo Figueiredo et al. (2011), ao caracterizarem epidemiologicamente a tuberculose em um rebanho bovino, relataram que a elevada diversidade de estirpes de *M. bovis* sugere a introdução de animais infectados proveniente de várias regiões geográficas.

CONCLUSÕES

A discriminação molecular pela técnica do *spoligotyping* permitiu identificar o polimorfismo entre os isolados de *Mycobacterium bovis* de bovinos abatidos no Estado da Bahia, sendo o espoligotipo SB121 o mais frequente.

Essa técnica, associada aos exames *post mortem* e bacteriológico permitiu um diagnóstico rápido dos isolados,

além de contribuir para investigação epidemiológica da tuberculose bovina, disponibilizando informações que auxiliarão os órgãos de vigilância sanitária no desenvolvimento de estratégias para o seu controle, além da detecção de novos focos de tuberculose no Estado da Bahia.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Araújo C.P. 2004. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 52p.
- Biffa D., Bogale A. & Skjerve E. 2010. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. BMC Public Health 10:462-474.
- Boniotti M.B., Gorla M., Loda D., Garrone A., Benedetto A., Mondo A., Tisato E., Zanoni M., Zoppi S., Dondo A., Tagliabue S., Bonora S., Zanardi G. & Pacciarini M.L. 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. J. Clin. Microbiol. 47:636-644.
- Brasil 2006. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. 188p.
- Brasil 2008. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobacterias. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF. 436p.
- 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 V.C. 2009. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. Zoonoses Publ. Health 56:465-470.
- Collins D.M. 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 151:2-7.
- Corner L.A. 1994. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:53-63.
- Cousins D.V., Francis B.R. & Gow B.L. 1989. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 20:89-95.
- Costa A.C.F., Silva N.S., Rocha V.C.M., Rodrigues C.A.R., Estrela-Lima A., Moreira E.L.T., Madruga C., Arruda S.M., Ferreira Neto J.S., Silva M.C.A. & Oliveira E.M.D. 2010. Tipificação genética, através da técnica de *Spoligotyping*, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 77:233-237.
- Costa L.B. 2012. Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 121p.
- De La Rúa-Domenech R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis 86:77-109.
- Duarte E.L., Domingos M., Amado A. & Botelho A. 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. Vet. Microbiol. 130:415-421.
- Figueiredo E.E.S., Ramos D.F., Medeiros L., Silvestre F.G., Lilenbaum W., Silva J.T., Paschoalin V.M.F. & Dellagostin O.A. 2011. Multiple strains of *Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. Veterinary J. Doi:10.1016/j.tvjl.2011.11.006.
- Gathogo S.M., Kuria J.K.N. & Ombui J.N. 2012. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a postmortem, microbiological and DNA molecular study. Trop. Anim. Health Prod. 44:1739-1744.
- Gibson A.L., Hewinson G., Goodchild T., Watt B., Story A., Inwald J. & Drobniński F.A. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 42:431-434.

- Haddad N., Masselot M. & Durand B. 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res. Vet. Sci. 76:1-18.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hughes S.L., Inwald J., Hewinson R.G. & Durand B. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. J. Clin. Microbiol. 39:3623-3632.
- Heinemann M.B., Mota P.M.P.C., Lobato F.C.F., Leite R.C. & Lage A.P. 2008. Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogênia e sinais clínicos. Cad. Téc. Vet. Zootec. 59:1-12.
- IBGE 2010. Efetivos dos rebanhos de grande porte em 31.12.2010, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, DF. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab03.pdf> Acesso em 29 set. 2012.
- 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. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35:907-914.
- Kantor I.N. & Ritacco V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet. Microbiol. 112:111-118.
- Kremer K., Van Soolingen D., Frothingham R., Haas W.H., Hermans P.W.M., Martín C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakus M.A., Musser J.M. & Van Embden J.D.A. 1999. 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. 37:2607-2618.
- Lilenbaum W. 2000. Atualização em tuberculose bovina. Revta Bras. Med. Vet. 22:145-151.
- McLernon J., Costello E., Flynn O., Madigan G. & Ryan F. 2010. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. J. Clin. Microbiol. 48:4541-4545.
- Michel A.L., Hlokwé T.M., Coetzee M.L., Mare L., Connaway L., Rutten V.P.M.G. & Kremer K. 2008. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. Vet. Microbiol. 126:151-159.
- Mota P.M.P.C., Lobato F.C.F., Assis R.A., Lage A.P. & Parreiras P.M. 2001. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53:1-3.
- Pacheco A.M., Hamzè A.L., Avanza M.F.B., Pereira D.M., Pereira R.E.P., Cipriano R.S. & Lot R.F.S. 2009. Tuberculose bovina: relato de caso. Revta Cient. Eletr. Med. Vet. 7(13):1-4.
- Parreiras P.M., Andrade G.I., Nascimento T.F., Oelemann M.C., Gomes H.M., Alencar A.P., Assis R.A., Mota P.M.P.C., Pereira M.A.S., Lobato F.C.F., Lage A.P. & Suffys P.N. 2012. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107:64-73.
- Reyes J.A.G., Casanova L.G., Torres C.R., Gallegos S.L.S., Alarcón G.J.C., Pezzat M.M., Martínez O.P., Chávez C.E. & Suazo F.M. 2012. Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. Prev. Vet. Med. 106:1-8.
- Richards W.D. & Wright H.S. 1983. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. J. Clin. Microbiol. 17:393-395.
- Rodriguez C.A.R., Zumárraga M.J., Oliveira E.M.D., Cataldi A.A., Romano M.I., Otto H.H., Bonafé V.L. & Ferreira Neto J.S. 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 71:277-282.
- Rodriguez C.A.R. 2005. Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 86p.
- Rodriguez S., Romero B., Bezos J., De Juan L., Alvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., González S., Sáez-Llorente J.L., Mateos A., Domínguez L. & Aranaz A. 2010. Spanish network on surveillance and monitoring of animal tuberculosis. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. Vet. Microbiol. 141:89-95.
- Rodriguez-Campos S., Aranaz A., Juan L., Sáez-Llorente J.L., Romero B., Bezos J., Jiménez A., Mateos A. & Dominguez L. 2011. Limitations of spoligotyping and variable-number tandem-repeat typing for molecular tracing of *Mycobacterium bovis* in a high-diversity setting. J. Clin. Microbiol. 49:3361-3364.
- Van Embden J.D., Van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., Van Der Zeijst B.A. & Schouls L.M. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J. Bacteriol. 182:2393-2401.
- Warren R.M., Gey Van Pittius N.C., Barnard M., Hesselting A., Engelke E., De Kock M., Gutierrez M.C., Chege G.K., Victor T.C., Hoal E.G. & Van Helden P.D. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 10:818-822.
- WHO 2012. Tuberculosis. Fact Sheet no.104. World Health Organization, Genève. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>> Acesso em 28 set. 2012.
- Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T.P., Oliveira R.S., Leão S.C., Fioravanti R.L., Roxo E., Zumárraga M., Romano M.I., Cataldi A. & Salas C.E. 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphnode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96:1-5.
- Zanini M.S., Moreira E.C., Salas C.E., Lopes M.T.P., Barouni A.S., Roxo E., Telles M.A. & Zumarraga M.J. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from South-East Brazil by spoligotyping and RFLP. J. Vet. Med. B 52:129-133.
- Zumarraga M.J., Arriaga C., Barandiaran S., Cobos-Marín L., De Waard J., Estrada-García I., Figueiredo T., Figueroa A., Giménez F., Gomes H.M., Gonzalez-y-Merchand J.A., Macías A., Milián-Suazo F., Rodríguez C.A.R., Santillán M.A., Suffys P.N., Tragoni M.D., Zárraga A.M. & Cataldi A. 2012. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. Res. Vet. Sci. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc>> Acessado 12 jul. 2012.