

CESAR ALEJANDRO ROSALES RODRIGUEZ

**Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no
Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e
epidemiológicos**

São Paulo
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CESAR ALEJANDRO ROSALES RODRIGUEZ

**Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no
Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e
epidemiológicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1498
FMVZ

Rosales Rodriguez, Cesar Alejandro

Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos / Cesar Alejandro Rosales Rodriguez.

- São Paulo: C. A. R. Rosales, 2005.

86 f.:il.

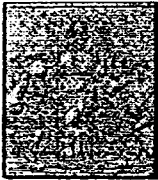
Teses (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

Programa de pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Tuberculose Bovina. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. *Spoligotyping*. 4. MIRU-VNTR. 5. Epidemiologia. I.Titulo




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vigilância epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de São Paulo" Protocolo nº 284/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Epidemiologic surveillance of bovine tuberculosis in São paulo State" protocol number 284/2003, under the responsibility of Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 01 de abril de 2003


Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROSALES RODRIGUEZ, Cesar Alejandro

Título: Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo
utilizando métodos moleculares e epidemiológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATORIAS

A don Oscar y doña Petra.

Mis hermanos Ciria, Gabriela,

Yamilet y Leonardo.

Y todos mis familiares.

Que aunque lejos siempre me apoyaron
en todos estos años.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao “O Homem” José Soares Ferreira Neto, pelo apoio, orientação e principalmente amizade durante estes anos de convivência, dos quais me ajudaram muito no meu aprendizado.

Obrigado Zezé.

A Doutora Vera Lídia Bonafé, mulher de muita garra, pois sem ela não seria possível a execução deste trabalho.

A Cristiene Rosa,
pelo carinho, amizade,
companheirismo, incentivo e,
principalmente paciência que teve
comigo durante a elaboração deste
trabalho.

Obrigado minha Preta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Silvio de Arruda Vasconcellos, pelo seu empenho na coordenação do curso de Pós-graduação do VPS.

Aos Professores Dr. Leonardo José Richtzenhaim e Dr. José Antonio Jerez pela sua amizade durante estes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira, pela amizade mostrada e companheirismo.

Aos professores do VPS, exemplos de pessoas de grande valor.

As funcionárias Laboratório de Zoonoses Bacteriana Gisele Oliveira de Sousa e Zenaide Maria de Moraes.

Ao Alexandre Sanches um grande homem.

Aos Funcionários do VPS.

Aos amigos camaradas companheiros e irmãos, Eugenia Márcia de Deus Oliveira, Paulo Eduardo Brandão, Laura Villareal, Fabio Gregori, Patrícia Ferreira.

Aos amigos de pós-graduação, Adriana, Silvio (Chagas), Rodrigo (Mogli), Rosana (Batatinha), Ricardo, Sergio, Daniela, Patrícia, Simone, Cristina, Leandro, Daniel, Mauricio, Adriano e Simone, Lara, Leticie e tantos outros. Obrigado pelas suas amizade e incentivos.

Ao pessoal do INTA Castelar Argentina: Dr Angel Cataldi, Dra Marisa Romano, Martin Zumarraga, Karina, Fabiana, Paz, Rosalia, Alicia Alito e todos aqueles que ajudaram.

Aos Veterinários do SISP, SIF, EDAS, CDA e abatedouros dos Estado de São Paulo que sem sua colaboração não seria possível a realização deste trabalho.

Apoio financeiro



E todos os grandes pensadores.

Muito Obrigado

Pancho

RESUMO

ROSALES RODRIGUEZ, C. A. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos.** [A molecular and epidemiological based-work system for detection of bovine tuberculosis focus in the state of São Paulo]. 2005. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Foi estabelecida uma parceria entre o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo e o Serviço de Inspeção Federal (SIF) para organizar um sistema capaz de detectar focos de tuberculose bovina no Estado, com base nas rotinas de inspeção de carcaças em abatedouros, cujos objetivos foram: 1) conhecer a diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* em bovinos no Estado de São Paulo; 2) estudar a distribuição espacial desses focos; 3) estudar a tipologia das unidades de criação de bovinos caracterizadas como focos de tuberculose; 4) verificar se é possível, com a atual infra-estrutura existente em São Paulo, operar um sistema de vigilância para detecção de focos de tuberculose bovina. Assim, foi estruturado um sistema de coleta, envolvendo as redes SISP (Sistema de Inspeção do Estado de São Paulo) e SIF, que realizou as coletas de materiais e informações de maio de 2002 a janeiro de 2004. Todo o material seguiu para o VPS, onde foram processados. As propriedades caracterizadas como focos foram rastreadas e delas foi coletada outro conjunto de informações. Seguem os resultados alcançados: 1) foram identificados 33 diferentes esporigotipos dentre os 248 isolados de *M. bovis* de bovinos no Estado de São Paulo. Os isolados do esporigotipo SB0295 foram re-discriminados em 13 novos perfis genéticos de *M. bovis* pela técnica MIRU-VNTR; 2) dentre os dois esporigotipos mais prevalentes estudados (SB0295 e SB0121), apenas o SB0295 apresentou-se de forma agrupada nas análises espaciais; 3) foram geradas várias informações sobre a tipologia e o manejo das unidades de criação de bovinos caracterizadas como focos de tuberculose; 4) a atual infra-estrutura existente no Estado de São Paulo foi capaz de operar um sistema de detecção de focos de tuberculose bovina.

Palavras-chave: Tuberculose Bovina. *Mycobacterium bovis*. *Spoligotyping*.

MIRU-VNTR. Epidemiologia.

ABSTRACT

ROSALES RODRIGUEZ, C. A. **A molecular and epidemiological based-work system for detection of bovine tuberculosis focus in the state of São Paulo.** [Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos]. 2005. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A partnership between the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health (VPS) of the FMVZ-USP, the Coordination of Agriculture and Animal Defense of the State of São Paulo, and the Federal Inspection Service (SIF) was established to organize a work system for detection of bovine tuberculosis focus in the state, based on routine methods of carcass inspection in the abattoir, with the following objectives: 1) to determine the genetic diversity of the isolates of *Mycobacterium bovis* from bovines in the state of São Paulo; 2) to study the spatial distribution of the focuses; 3) to study the typology of the bovine breeding units (farms), which were characterized as tuberculosis focus; 4) to verify the possibility of operating a surveillance system for detection of bovine tuberculosis focus based on the current network in the state of São Paulo. Thus, it was performed a system for data collection involving the current systems SISP (System of Inspection of the State of São Paulo) and SIF, who performed the collection of biological samples and information from May 2002 to January 2004. All samples were addressed to the VPS, where they were processed. Farms characterized as focus were traced to obtain new information. The results obtained in this study follow: 1) A total of 33 different spoligotypes were determined out of 248 bovine isolates of *M. bovis* in the state of São Paulo. The spoligotype SB0295 isolates were re-discriminated into 13 new *M. bovis* genetic profiles by the MIRU-VNTR technique; 2) From the two most prevalent spoligotypes analyzed in this study (SB0295 e SB0121), only SB0295 showed a cluster presentation by the spatial analyses; 3) Several information about typology and bovine breeding unit management were generated regarding the status of tuberculosis focus; 4) the current network in the state of São Paulo was capable of operating a system for detection of bovine tuberculosis focus.

Keyword: Bovine tuberculosis. *Mycobacterium bovis*. Spoligotyping. MIRU-VNTR. Epidemiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do método MIRU-VNTR para 48 isolados de <i>M. bovis</i> do Estado de São Paulo, pertencentes ao espoligotipo SB0295.	47
Tabela 2: Resultados do método MIRU-VNTR para 48 isolados de <i>M. bovis</i> do estado de São Paulo pertencentes ao espoligotipo SB0295, mostrando a capacidade discriminatória do método, denominada de padrão MIRU.	49
Tabela 3: Valores preditivos do diagnóstico realizado pelos inspetores de carnes das estruturas SIF e SISP.	52
Tabela 4: Distribuição das lesões na carcaça, segundo o resultado dos exames bacteriológicos.	52
Tabela 5: Características dos animais condenados em matadouro por tuberculose, segundo os resultados bacteriológicos.	53
Tabela 6: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a tipologia da exploração.	53
Tabela 7: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo o número de animais.	53
Tabela 8: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a origem dos animais introduzidos.	54
Tabela 9: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a prática de venda de animais.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Dendograma baseado em UPGMA (Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average) a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica *spoligotyping* para isolados de *M. bovis* de bovinos do Estado de São Paulo. Resultados obtidos através do programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System). 37
- Figura 2: Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, segundo os espoligotipos de *M. bovis* isolados. 40
- Figura 3: Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, com destaque para o espoligotipo SB0121. 41
- Figura 4: Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, com destaque para o espoligotipo SB0295. 42
- Figura 5: MIRU-VNTR 16, mostrando polimorfismo nas amostras 26, 27 e 38 (da esquerda para direita). 44
- Figura 6: MIRU-VNTR 26, mostrando o padrão de migração em gel das amostras não polimórficas, 31 e 41 (489pb), comparadas as polimórficas 12 (438pb), 23 (540pb), 33 (387pb), 39 (540), e 43 (540pb). 45
- Figura 7: MIRU-VNTR 27, mostrando polimorfismo das amostras 2 e 9 (da esquerda para a direita). 45
- Figura 8: MIRU-VNTR 39, mostrando polimorfismo da amostra 5. 46
- Figura 9: MIRU-VNTR 40, mostrando polimorfismo da amostra 30. 46
- Figura 10: PRA-PCR, mostrando amplificação de fragmento de 439pb para as amostras de 1 a 4. 50

Figura 11: Amplificados de 439pb submetidos ao tratamento com enzima *Bst*II, mostrando produtos amplificados de 245 e 220pb (*M. avium* tipo I) para as amostras de 1 a 4. As seis amostras não identificadas na figura são isolados que apresentaram produtos amplificados de 240, 120 e 85pb (complexo *M. tuberculosis*). 51

Figura 12: Amplificados de 439pb submetidos ao tratamento com enzima *Hae*III, mostrando produtos amplificados de 140 e 105pb (*M. avium* tipo I) para as amostras de 1 a 4. As seis amostras não identificadas na figura são isolados que apresentaram produtos amplificados de 150, 130 e 70pb (complexo *M. tuberculosis*). 51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista dos abatedouros que integraram o sistema de coleta de amostras. São Paulo, 2005.	29
Quadro 2: Resultados da tentativa de isolamento de micobactérias pelo método Petroff	35
Quadro 3: Resultados da tentativa de isolamento de micobactérias pelo método HPC	35
Quadro 4: Espoligotipos de <i>M. bovis</i> identificados em 248 isolados de bovinos do Estado de São Paulo	36
Quadro 5: Frequência de espoligotipos de <i>M. bovis</i> , segundo os focos de tuberculose bovina rastreados no Estado de São Paulo	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Diferença entre os valores da função K para propriedades foco do espoligotipo SB0121 e foco para qualquer outro espoligotipo em função da distância em metros. 43

Gráfico 2: Diferença entre os valores da função K para propriedades foco do espoligotipo SB0295 e foco para qualquer outro espoligotipo em função da distância em metros. 43

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%= por cento

DNA = ácido desoxirribonucléico

DVR = Direct Variant Repeat

μL = microlitro

μm = micrometro

°C = graus Celsius

et al., = e colaboradores

g = aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s²)

M = molar

mL = mililitro

mM = milimolar

N = normal

pH = concentração de hidrogênio iônico

pb = pares de bases

Taq = *Thermus aquaticus*

TE = tampão Tris-EDTA

SDS = dodecilsulfato de sódio

PCR = Polymerase Chain Reaction

RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism

VNTR = variable number tandem repeat

MIRU = Mycobacterial interspersed repetitive units

GPS = Global Positioning System

HPC = Hexadecyl pyridinium chloride

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Instituições parceiras	26
2.2 Sistema de coleta das amostras	26
2.3 Processamento das amostras em laboratório	28
2.4 Rastreamento dos focos	29
2.5 Análise dos resultados	29
3 RESULTADOS	32
3.1 Obtenção de isolados BAAR	32
3.2 <i>Spoligotyping</i>	32
3.3 Rastreamento dos focos	34
3.4 Análises da distribuição espacial dos focos	35
3.5 MIRU-VNTR	41
3.6 PCR-PRA	47
3.7 Análise do banco de dados	49
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES	61
6 REFERÊNCIAS	62
7 ANEXOS	71
Anexo 1	71
Anexo 2	73
Anexo 3	73
Anexo 4	74
Anexo 5	75
Anexo 6	77
Anexo 7	78
Anexo 8	80
Anexo 9	82

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, apesar de ter sido erradicada ou eficientemente controlada nos países mais organizados, continua sendo um grande problema para o desenvolvimento pecuário de um grande número de países em desenvolvimento. Grande parte dos programas exitosos foram deflagrados no início do século XX (DOLPHIN et al., 1994).

O Brasil, apesar de algumas iniciativas, não observou até agora melhoras significativas da situação epidemiológica da doença no seu território.

Dada a ineficiência das ações até então conduzidas, o governo federal, em 11 de janeiro de 2001, instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), o qual tem como objetivos específicos: a) baixar a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose e b) criar um número significativo de propriedades certificadas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (www.agricultura.gov.br). O maior impacto recairá sobre a bovinocultura, por se tratar de uma população que em 1998 já era de 163 milhões de cabeças distribuídas em cerca de 2,6 milhões de propriedades, na maioria do tipo rural, sendo: 74% dos animais com aptidão para a produção de carne, 20%, para a produção de leite e 6% com dupla aptidão (FERREIRA NETO et al., 1997).

Tradicionalmente o combate à tuberculose bovina faz-se inicialmente pela implementação de uma rotina de testes tuberculínicos para a certificação de propriedades livres. O passo seguinte, quando o programa já atingiu grande parte dos rebanhos e a frequência da doença sofreu declínio importante, agrega-se à essa estratégia o rastreamento de focos a partir de matadouro (BROWN et al., 1998). Esta

estratégia representa um passo importante para a erradicação e vigilância epidemiológica da doença (ESSEY, 1994; KANTOR; RITACCO, 1994; TWEDDLE; LIVINGSTONE, 1994) e o momento de sua implementação deve ser escolhido pelas autoridades sanitárias que gerenciam o programa, levando em consideração a experiência já acumulada e pré-requisitos para esse sistema de vigilância (boa cobertura do sistema de inspeção de carnes, caráter compulsório das ações desencadeadas a partir da detecção da doença e existência de fundo de indenização).

Esta estratégia tem sido empregada com bons resultados em diversos países em fases adiantadas de seus programas nacionais de controle (ESSEY, 1994; KANTOR; RITACCO, 1994; TWEDDLE LIVINGSTONE, 1994), como no caso de Cuba, que está praticamente livre de tuberculose bovina, onde o rastreamento substituiu a tuberculinização e eliminação de animais reagentes, visto que o valor preditivo positivo da prova decresce juntamente com a prevalência real (KANTOR; RITACCO, 1994). Neste país entre 1985 e 1988, 15 milhões de exames realizados levaram a condenação de 11 mil animais reagentes, não encontrando lesões em nenhum deles durante a inspeção. Em compensação, na Argentina onde a prevalência é alta, 80% dos animais positivos à prova de tuberculinização apresentaram lesões sugestivas (KANTOR; RITACCO, 1994).

No Brasil é diferente. Devido ao tamanho do país e de seu rebanho, as estratégias de controle devem respeitar as peculiaridades de cada região. Com isso, o Estado de São Paulo, que possui uma vasta rede de abatedouros com Serviços de Inspeção Federal (SIF) e Estadual (SISP), poderia adotar o rastreamento de focos no início do programa. A localização e mapeamento das propriedades positivas poderão ser úteis para evidenciar áreas de risco e, desta maneira, auxiliar na racionalização de recursos e no estabelecimento de prioridades.

Portanto, um sistema de vigilância para tuberculose bovina a partir de matadouro é parte essencial de um programa de controle e erradicação, e a escolha do melhor momento para a sua implementação dependerá de uma análise criteriosa da situação epidemiológica da doença, grau de amadurecimento de programa, disponibilidade de infra-estrutura e de recursos financeiros.

Um ponto fundamental no sistema de vigilância para tuberculose bovina é a eficiente caracterização bacteriológica dos focos. As técnicas microbiológicas clássicas usadas no isolamento de micobactérias revelam baixa sensibilidade, levando a perdas consideráveis nos processos de descontaminação; além disso, há o consumo de várias semanas entre o isolamento primário e a identificação final da espécie (CORNER, 1994). Ocorre também perdas devido a má conservação das amostras enviadas ao laboratório (CORNER, 1994; RICHARDS; WRIGHT, 1983).

As lesões devem ser mantidas a uma temperatura ideal de 4 a 6° C e cultivadas entre 24 e 48 h após a colheita. Não sendo possível ser feito este procedimento, as amostras devem ser congeladas e mantidas a -20° C até o processamento no laboratório (CORNER, 1994). Atender a esses requisitos é bastante complexo considerando-se as condições climáticas brasileiras e outros fatores que vão desde o uso rotineiro de meios de transporte rápido, o que é dispendioso, pois, no frete, devem ser incluídos o gelo e caixas isolantes térmicas. Para contornar o problema, pode-se fazer uso da solução saturada de borato de sódio, ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) bórax, como meio conservante das lesões, o qual preserva as micobactérias no tecido por até 60 dias em temperatura ambiente e dispensa na maioria dos casos os métodos de descontaminação empregados no cultivo (RICHARDS; WRIGHT, 1983; HERNÁNDEZ DE HANDA et al., 1997).

Para fazer o diagnóstico definitivo da tuberculoses é necessário seu cultivo e identificação. O método de visualização de micobactérias através da coloração de Ziehl-

Neelsen, a despeito de ser rápido e barato, só consegue revelar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes em concentrações superiores a 10^4 bactérias por mL, sendo que esta técnica não permite distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae* (BARKSDALE; KIM, 1977) e outros microrganismos tais como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* que tem as mesmas características tintoriais (PRITCHARD, 1988).

Com o intuito de ajudar e facilitar a rotina de identificação das micobactérias, outros métodos têm sido propostos, tais como a cromatografia em camada delgada que não obteve grande difusão; a radiometria, que diminui o tempo para a detecção e identificação, mas depende de cultivos e do manuseio de radioisótopos (COUSINS et al., 1991) e, finalmente, a reação em cadeia da polimerase PCR, *Polymerase Chain Reaction*, que representa uma ferramenta de grande ajuda para os métodos diagnósticos, sendo a técnica bioquímica mais difundida desde a sua criação em 1983 (MULLIS, 1990). Esta empregada diretamente em amostras clínicas, pode fazer a detecção e identificação do agente em poucas horas (SAKAMOTO, 2001). A PCR é um método de síntese enzimática *in vitro* de pequenas quantidades de DNA ou RNA (SAIKI et al., 1985) que podem provir de diferentes origens como tecidos, fluidos corporais, ossos, pêlos, dentes, amostras forenses ou peles secas de museu (GINGERAS et al., 1990; PERSING, 1991; ERLICH et al., 1991).

Já existe para a tipificação de *Mycobacterium tuberculosis*, por uma técnica padrão ouro estabelecida: a RFLP — *Restriction Fragment Length Polymorphism*, utilizando como marcador biológico uma sonda derivada da seqüência de inserção IS6110 (van EMBDEN et al., 1993; GENEWEIN et al., 1993). A mesma técnica, porém, quando testada em isolamentos de *Mycobacterium bovis*, apresenta uma

capacidade pequena de discriminação entre elas, ou seja, pouco polimorfismo, porque esta espécie possui frequentemente um número baixo de cópias de *IS* 6110 em seu genoma (SZEWZYK et al., 1995; COUSINS et al., 1998). Este problema pode ser contornado com o uso complementar de vários marcadores biológicos. Aplicando às mesmas estirpes as sondas genéticas derivadas de DR e PGRS (van EMBDEN et al., 1996) é possível encontrar padrões polimórficos onde o *IS* 6110 não pôde diferenciar (ROMANO et al., 1996; COUSINS et al., 1998). Outro fator limitante à aplicação da RFLP em maior escala é a necessidade de grande massa de DNA o que demandaria subcultivos das micobacterias isoladas, isso torna desejável o emprego de métodos de tipificação em PCR (ou amplificação gênica) como o *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

O emprego da técnica de *spoligotyping*, que é baseado no polimorfismo de DNA presente em um locus cromossomal particular, a região de repetição direta, *Direct Repeat* (DR), presente apenas nas bactérias do Complexo *M. tuberculosis*. Este locus foi descrito primeiramente por Hermans et al., (1991) que seqüenciou esta região em *M. bovis* BCG. A região DR em *M. bovis* BCG consiste de seqüências repetidas de 36 pares de base e o número de cópias de DR foram determinados como 49. Em outras estirpes do Complexo *M. tuberculosis* o número de elementos DR apresentou grande variação. A grande maioria das estirpes contém um ou mais elementos *IS* 6110 na região de DR.

Em contraste às DR's, como os espaçadores estão comumente presentes uma única vez na região DR, mas, ocasionalmente, alguns são encontrados duas vezes, tanto separado por um como por vários DR's e outros espaçadores. Uma DR e seu espaçador não-repetitivo anexo é chamado DVR (*Direct Variant Repeat*). Quando as regiões DR de várias estirpes foram comparadas, foi observada que a ordem dos espaçadores permanece a mesma em todas elas, mas deleções/inserções dos espaçadores e DR's

ocorrem (GROENEN et al., 1993). Os mecanismos com que os espaçadores e as cópias de DR são geradas é desconhecido. Com o método descrito aqui, a presença ou ausência na região DR de 43 espaçadores de seqüência conhecida pode ser detectada realizando um PCR deste material e posterior hibridação com um conjunto de oligonucleotídeos imobilizados, representando cada um uma seqüência específica de cada espaçador. Com isso, tal método recebeu o nome de *spoligotyping*, designação oriunda de *spacer oligonucleotide typing* (KAMERBEEK et al., 1997).

Através do *spoligotyping* podemos detectar a presença ou ausência dos espaçadores de seqüência conhecida. O primeiro passo no método é amplificar a região DR da estirpe em estudo por PCR. Os *primers* usados são baseados na seqüência do DR e permite a amplificação dos espaçadores entre as DR's. O produto de PCR obtido difere em tamanho por duas razões: primeiro, o amplificado contém muitos espaçadores com suas DR's se os *primers* anelarem 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.

Os oligonucleotídeos derivados de espaçadores conhecidos são covalentemente ligados em linhas paralelas a uma membrana de nylon ativada. Os produtos de PCR são hibridados perpendicularmente às linhas dos oligonucleotídeos. Após a hibridação, a membrana é incubada em streptavidina-peroxidase que reage com a biotina marcada nos produtos da PCR. A detecção do sinal de hibridação é feito pelo sistema de detecção quimioluminescência. A peroxidase presente na streptavidina catalisa a reação, resultando na emissão de luz que pode ser detectada por filme de raio-X. Por utilizar a PCR em uma das etapas, o *spoligotyping* pode ser aplicado diretamente em amostras clínicas permitindo a detecção, a identificação e a diferenciação de estirpes de *M. bovis*

simultaneamente (ARANAZ et al., 1996; KAMERBEEK et al., 1997).

Assim, o *spoligotyping* possibilita a detecção e a tipificação simultâneas de micobactérias do Complexo tuberculosis (KAMERBEEK et al., 1997), e é indicada como técnica de eleição para a comparação de estirpes 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 VNTR (*variable number tandem repeat*) é o método de rotina para a medicina forense e para os testes de paternidade (JEFFREYS et al., 1991). No genoma do *M. tuberculosis* foram encontradas várias seqüências repetitivas em série, também chamadas mini-satélites ou MIRU (*Mycobacterial interspersed repetitive units*) (SUPPLY et al., 2000; GORDON et al., 1999). Foram encontrados 41 lócus no *M. tuberculosis* onde se observou que algumas delas manifestavam maior performance na identificação destes mini-satélites por serem mais polimórficas (GORDON et al., 1999; FROTHINGHAM et al., 1998) seqüências MIRU, têm sido empregadas em estudos epidemiológicos. Elas estão distribuídas em vários lócus, variando de 40 a 100 bp. Para a análise, cada MIRU é amplificada separadamente por PCR, usando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a seqüência e o número de repetições da seqüência foi calculado pelo tamanho do produto amplificado.

O uso do Sistema de Informação Geográfica (GIS) para o gerenciamento de serviços de saúde e o controle de doenças tem sido uma das áreas de maior expansão na epidemiologia (SANSON et al., 1991; MCGINN III et al., 1996). Com a tecnologia GPS (*Global Positioning System*) é possível obter as coordenadas de qualquer ponto geográfico com precisão de metros. Os pontos georreferenciados podem ser empregados

no GIS para a construção de mapas que podem, ainda, incorporar várias informações como relevo, clima, bacias hidrográficas e malha rodoviária.

Com o uso das informações geradas por GIS/GPS, associado à tipificação genética das *M. bovis* isoladas cada foco é individualizado, podendo-se identificar quais deles têm origem comum. Através da recuperação de dados como praças de comercialização, estradas de acesso, pode-se, por exemplo, localizar a fonte de transmissão de cada estirpe tipificada ou localizar áreas e fatores de risco. Ainda pensando em vigilância epidemiológica, será possível diferenciar nos focos reincidentes os casos de reintrodução da doença daqueles com persistência do mesmo foco não controlado ou mesmo comprovar a existência de reservatórios silvestres.

Assim sendo, o presente projeto tem por objetivos:

1. conhecer a diversidade genética de isolados de *M. bovis* em bovinos no Estado de São Paulo;
2. estudar a distribuição espacial desses focos;
3. estudar a tipologia das unidades de criação de bovinos caracterizadas como focos de tuberculose;
4. verificar se é possível, com a atual infra-estrutura existente em São Paulo, operar um sistema de vigilância para detecção de focos de tuberculose bovina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instituições parceiras

Este trabalho é uma ação organizada entre três instituições públicas, a saber: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA) e Serviço de Inspeção Federal (SIF).

2.2 Sistema de coleta das amostras

Durante o período de maio de 2002 a janeiro de 2004, 79 abatedouros bovinos do Estado São Paulo participaram do esforço de coleta das amostras (Quadro 1). Desses, 37 eram da rede SIF e 42 da rede SISP (Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo).

Quadro 1: Lista dos abatedouros que integraram o sistema de coleta de amostras. São Paulo, 2005.

Abatedouro	inspeção	município
Friboi LTDA	SIF 0385	Andradina
Frigorífico BABY BEEF LTDA	SIF 1922	Andradina
Frigorífico Alta Noroeste LTDA	SIF 2830	Araçatuba
FRicouros Industria e Comercio LTDA	SISP 0103	Araçatuba
Assiscarnes Distribuidora de Carnes LTDA	SISP 0458	Assis
Elisabgela A. Anastácio – ME	SISP 0916	Assis
Frigorífico Auriflama LTDA	SISP 0229	Auriflama
Frovale-Indústria e Com de Carnes LTDA	SISP 0664	Bady Bassit
Comercial de Carnes Barbosense	SISP 0041	Barbosa
Abatedouro de Bovinos e Suínos Sapucaí LTDA	SIF 1387	Barretos
Touro do Vale Com. De Carnes LTDA	SISP 0021	Barretos
Frigorífico J. D. LTDA	SISP 0393	Barretos
Ind. E Com. De Carnes Minerva LTDA	SIF 0421	Barretos
Frigorífico Vangelio Mondelli LTDA	SIF 1758	Bauru
Abatedouro Bebedouro LTDA	SISP 0974	Bebedouro
Frigorífico Cowpig LTDA	SISP 0543	Boituva
R. M. Antunes – ME	SISP 0971	Cajati
Instituto de tecnologia de alimentos	SISP 0065	Campinas

Frigonel Industria e Com. De alimentos LTDA	SISP 0979	Campinas
Frigorífico Vale das Águas	SIF 2489	Campinas
Frigorífico JG LTDA	SISP 0846	Catanduva
Frigorífico Campos Salles LTDA	SISP 0593	Cosmópolis
Frigorífico Cleumar	SIF 0336	Cruzeiro
Norte Rio Pretense Distribuidora LTDA	SISP 0216	Eng. Schimidt
Frigoestrela	SIF 2924	Estrela D' oeste
Frigorífico Mozaquatros	SIF 0333	Fernandópolis
Frigorífico Itarumá	SIF 3659	Fernandópolis
Frigorífico Sta Esmeralda.	SIF 4448	Guapiaçu
Franco Fabril Alimentos.	SIF 1885	Guararapes
Frigorífico Ilha Solteira	SISP 0936	Ilha Solteira
Olho D'água Ind e Com Carnes LTDA	SIF 0070	Ipua
Paulo Viola Itarpira – ME	SISP 0918	Itapira
Sta Esmeralda Alim. LTDA	SIF 0111	Jaboticabal
APR Alimentos LTDA	SIF 2241	Jales
Ind. E Com. De Carnes Minerva LTDA	SIF 0451	José Bonifácio
Frigorífico José Bonifácio LTDA	SIF 2729	José Bonifácio
Frigorífico ouroeste LTDA	SISP 0876	Juquiá
Sta Helena Leme Dist. Carnes LTDA	SISP 0557	Leme
Frigorífico Sta Bárbara	SISP 0768	Lençóis Paulista
Frigol Comercial LTDA	SIF 2960	Lençóis Paulista.
Bertin LTDA	SIF 0337	Lins
Frigorífico Fribordogue LTDA	SISP 0391	Louveira
Prefeitura Municipal Lucélia	SISP 0039	Lucélia
Frigorífico Comercial Bossoni LTDA	SISP 0491	Lupercio
Frigorífico Bege LTDA	SISP 0832	Mariapolis
CM'S Gyuninik Frigorífico LTDA	SIF 0122	Martinópolis
CLT matadouro S/C LTDA-ME	SISP 0446	Matão
Lourival M. de Castilho e Filho LTDA	SISP 0500	Monte Castelo
Matadouro Morro Agudo S/C LTDA	SISP 0805	Morro Agudo
Marlene de Fátima Rodrigues e Cia LTDA	SISP 0930	Novo Horizonte
Frisane – Frigorífico Sta Neusa	SIF 3332	Oswaldo Crus
Frigorífico Mantedo Paraná	SIF 0330	Panorama
Abatedouro Triunfo LTDA	SISP 0466	Pedreira
João Bosco Nunes Abatedouro	SISP 0352	Pindamonhangaba
Frigorífico Raja	SIF 0081	Piracicaba
Frigorífico Angelelli LTDA	SIF 2259	Piracicaba
Orlando Bomediano Castilho e Cia LTDA	SISP 0767	Pirapozinho
Frigorífico Supremo	SIF 1365	Pirapozinho
Pref do Campus Administ. De Pirassununga	SISP 0830	Pirassununga
Faz. Da Aeronáutica de Pirassununga	SISP 0973	Pirassununga
Distribuidora de carnes Renasença	SIF 2811	Presidente Bernardes
Frigorífico Prudentino LTDA	SISP 0212	Presidente Prudente
Geil Mora Presidente Prudente	SISP 0472	Presidente Prudente
Bom Mart Frigorífico LTDA	SIF 2121	Presidente Prudente
Marfrig	SIF 2543	Promissão
Frigoclass Frigorífico LTDA	SIF 3712	Promissão
Walter Fornel Franca- ME	SISP 0743	S. J. da Barra
Frigorífico Vale do Prata LTDA	SIF 1616	São João da Boa Vista
Frigorífico MR Com. Ind. E exportação LTDA	SISP 0009	São Jose do Rio Preto
Comercial de carnes e derivados Val Gentil	SISP 0111	São Jose do Rio Preto
Frigorífico Boi Rio LTDA	SISP 0881	São Jose do Rio Preto
Frigorífico Mantiqueira LTDA	SIF 0222	São Jose dos Campos
Pereira Barreto Imp. Exp. De Carnes LTDA	SISP 0865	São Jose Rio Preto
Frigorífico Suin Quality LTDA	SIF 4670	São Manoel
Barra Mansa Com. De Carnes e Derivados.	SIF 0941	Sertãozinho
Itajara Comercio de Carnes	SIF 2613	Sta Crus do Rio Pardo
Abatedouro Beira Rio	SISP 0098	Sta Cruz do Rio Pardo
Tatuibi Industria de Alimentos LTDA	SIF 0545	Sta Fé do Sul
Comercio de Carnes Taquaritinga	SIF 0339	Taquaritinga

Assim, no período especificado, foi colhida uma amostra da lesão granulomatosa de todas as carcaças condenadas por tuberculose durante a rotina de inspeção. Em cada oportunidade, também foi preenchida uma guia acompanhatória (anexo 1). Os fragmentos de tecido coletados foram imersos em solução saturada de borato de sódio. Foi utilizado um frasco para cada indivíduo. Então, os frascos contendo as amostras e as respectivas guias acompanhatórias foram encaminhadas para o LZB-VPS-FMVZ (Laboratório de Zoonoses Bacterianas), onde foram processadas visando o isolamento de micobactérias. Desde a coleta até o processamento não foi excedido o prazo de dois meses.

2.3 Processamento das amostras em laboratório

No LBZ, cada amostra foi macerada em *stomacher*, descontaminada pelo método de Petroff (anexo 2), semeada em meios de Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973) e incubada a 37° C por até 90 dias. Uma alíquota do homogeneizado foi mantida a -20° C para análises ulteriores.

As colônias com características sugestivas de micobactérias foram fixadas em lâmina de vidro e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972) para pesquisa de BAAR.

As amostras que não apresentaram crescimento de BAAR foram submetidas à nova tentativa de isolamento de micobactérias, utilizando-se como método de descontaminação o HPC (anexo 3).

Todas as amostras BAAR positivas foram extraído o DNA (anexo 4) e

submetidas à identificação pelo método de *spoligotyping* (anexo 5), que possibilita a detecção e tipificação das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, sendo também indicada como técnica de eleição para a discriminação molecular de estirpes de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*.

Os isolados pertencentes ao espoligotipo SB0295 (www.mbovis.org) foram submetidos à técnica MIRU (SUPPLY et al., 2000) (anexo 6).

Os isolados BAAR que não foram caracterizados como complexo *M. tuberculosis* pelo *spoligotyping* foram identificados pela técnica PCR–PRA (TELENTI et al., 1993) (anexo 7).

2.4 Rastreamento dos focos

As unidades de criação que foram caracterizadas como foco bacteriológico de tuberculose bovina (isolamento de *M. bovis* de pelo menos um de seus animais), foram rastreadas com base nos dados coletados pela guia acompanhatória. Essas propriedades foram visitadas e nelas foi aplicado um questionário epidemiológico (anexo 8) e colhidas as coordenadas (latitude e longitude) através de aparelho GPS (*Global Positioning System*).

2.5 Análise dos resultados

Os padrões genéticos de *M. bovis*, obtidos pela técnica de *spoligotyping*, foram analisados através do programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate*

Analysis System), que construiu um dendograma a partir dos graus de similaridade entre as amostras baseado em UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method Using Arithmetic Average*), utilizando a análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard, (HUNTER E GASTON, 1988).

Os dados da ficha acompanhatória e do questionário epidemiológico foram armazenados num banco de dados especialmente construído utilizando-se o programa Microsoft *Access*[®] e posteriormente analisados pelo programa *SPSS*[®].

A localização espacial dos focos de tuberculose bovina (latitude e longitude), combinada à discriminação molecular dos isolados de *M. bovis* (*spoligotyping*), permitiu a confecção de mapa temático da doença para o Estado de São Paulo. Nessa operação foi utilizado o programa ArcView 3.1 (ESRI INC., 1996). Esse mapa foi utilizado na análise para verificação da existência de agrupamento espacial (cluster) dos dois espoligotipos mais frequentemente isolados (SB0295 e SB0121).

Uma das possibilidades para verificação de agrupamentos espaciais é a comparação da distribuição obtida com uma distribuição espacial aleatória. Entretanto, essa análise tem como pressuposição que o processo é isotrópico ou homogêneo e, no caso das doenças, sabe-se que a intensidade do aparecimento de casos varia com a densidade populacional, que normalmente não é homogênea. Assim, esse método tem aplicação limitada na investigação de agrupamentos de doenças (ELLIOT et al., 1992; BAILEY; GATRELL, 1995; CARPENTER, 2001).

Uma maneira alternativa para verificar a presença de agrupamento de doenças pode ser empregada quando da existência de um grupo ou processo controle que atue como substituto da população sob risco, representando suas variações espaciais (BAILEY; GATRELL, 1995). Nesse caso, supondo que n_1 seja o número de casos observados na área de estudo R e n_2 uma mostra aleatória de controles da mesma

região R , tem-se que $n=n_1+n_2$ eventos. Se não há agrupamentos dos casos em relação aos controles, significa que os casos são uma amostra aleatória dos padrões somados de casos e controles. Assim, a hipótese a ser testada é a de identificação aleatória de casos e controles. Essa hipótese não faz pressuposições sob a forma dos processos envolvidos no aparecimento de casos e controles. Para testá-la pode-se utilizar a função K .

Sob a hipótese de identificação aleatória, os padrões de casos e controles, tomados individualmente, representam uma redução aleatória do processo espacial combinado. A função K , por definição, é invariante para reduções aleatórias, portanto $K_{11}(h)=K_{22}(h)=K_{12}(h)$.

Assim, um modo simples de identificar o afastamento diferente do padrão espacial aleatório é verificar a significância da diferença entre as estimativas dessas funções. Se casos são eventos do tipo 1 e controles eventos do tipo 2, pode-se utilizar um gráfico $K_{11}(h)-K_{22}(h)$ como função de h (distância) para verificar o afastamento da pressuposição de identificação aleatória. Nesse caso, os picos representam agrupamento de casos. O limite superior e inferior dessa curva, utilizados para verificar a significância dos picos, são estimados a partir de valores de K_{11} e K_{22} , calculados em repetidas simulações utilizando n_1+n_2 localizações fixas, porém identificando aleatoriamente n_1 localidades como casos (BAILEY; GATRELL, 1995).

3 Resultados

3.1 Obtenção de isolados BAAR

O Quadro 2 traz um demonstrativo do número de amostras recebidas e processadas pelo método de Petroff, visando o isolamento de micobactérias, bem como o número de isolados BAAR obtidos.

Quadro 2: Resultados da tentativa de isolamento de micobactérias pelo método Petroff

número de amostras recebidas	588
número de amostras processadas pelo método Petroff	588
número de isolados BAAR	248

Todas as 340 amostras processadas pelo método de Petroff que não resultaram em isolamento de BAAR foram submetidas à nova tentativa de isolamento, pelo método HPC. Os resultados constam do Quadro 3.

Quadro 3: Resultados da tentativa de isolamento de micobactérias pelo método HPC

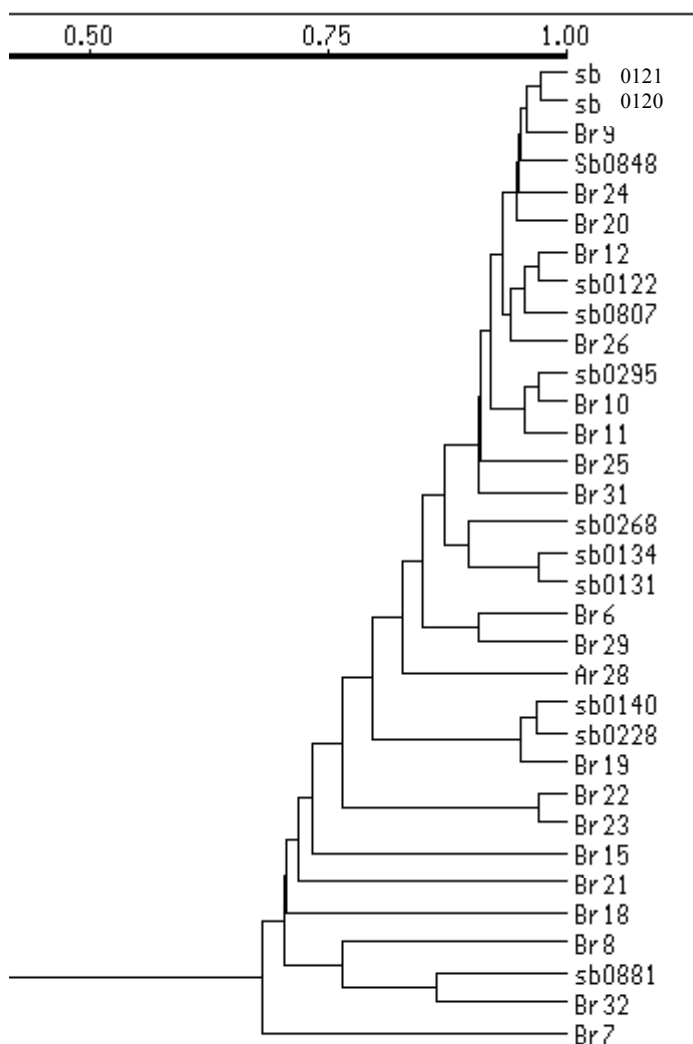
número de amostras processadas pelo método HPC	340
número de isolados BAAR	47

Portanto, obtivemos um total de 295 isolados BAAR.

3.2 *Spoligotyping*

Os 295 isolados BAAR foram submetidos à técnica de *spoligotyping* e 248 delas foram classificadas como *M. bovis*. Esses resultados estão condensados no Quadro 4 e na Figura 1. O anexo 9 traz todos os resultados obtidos pela técnica de *spoligotyping*.

Figura 1: Dendograma baseado em UPGMA (Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average) a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica *spoligotyping* para isolados de *M. bovis* de bovinos do Estado de São Paulo. Resultados obtidos através do programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).



3.3 Rastreamento dos focos

Com base nos resultados bacteriológicos e nas guias acompanhatórias das amostras colhidas nos abatedouros, foi possível rastrear 144 unidades de criação caracterizadas como focos de *M. bovis*. A localização geográfica desses 144 focos,

aliada à discriminação molecular pela técnica de *spoligotyping* foram empregadas nas análises espaciais.

3.4 Análises da distribuição espacial dos focos

O Quadro 5 traz os resultados da discriminação molecular, pela técnica de *spoligotyping*, dos 144 focos de *M. bovis* que serviram de base para as análises espaciais.

Quadro 5: Frequência de espoligotipos de *M. bovis*, segundo os focos de tuberculose bovina rastreados no Estado de São Paulo.

<i>espilgotipo</i>	número de focos
SB0121	43/144 (29,9%)
SB0295	36/144 (25%)
SB0120	13/144 (9%)
SB0134	3/144 (2,1%)
SB0140	9/144 (6,25%)
SB0122	1/144 (0,7%)
SB0807	1/144 (0,7%)
SB0881	12/144 (8,3%)
AR24	2/144 (1,4%)
BR6	2/144 (1,4%)
BR7	2/144 (1,4%)
BR8	1/144(0,7%)
BR10	2/144 (1,4%)
BR11	1/144 (0,7%)
BR12	1/144 (0,7%)
BR15	2/144 (1,4%)
BR19	2/144 (1,4%)
BR20	5/144 (3,5%)
BR22	1/144 (0,7%)
BR23	1/144 (0,7%)
BR24	1/144 (0,7%)
BR25	1/144 (0,7%)
BR29	1/144 (0,7%)
BR31	1/144 (0,7%)
TOTAL	144/144 (100%)

O Quadro 5 mostra que nos focos rastreados, os espilgotipos SB0121 e SB0295 permaneceram os mais freqüentes. Assim, as análises espaciais restringiram-se a esses dois espilgotipos.

A Figura 2 mostra a localização espacial dos 144 focos de tuberculose bovina identificados no Estado de São Paulo, trazendo também a caracterização molecular desses focos, realizada pela técnica de *spoligotyping*. As Figuras 3 e 4 trazem o mesmo mapa temático, com destaque apenas para os espoligotipos SB0121 e SB0295, respectivamente. Os Gráficos 1 e 2 trazem os resultados das análises espaciais.

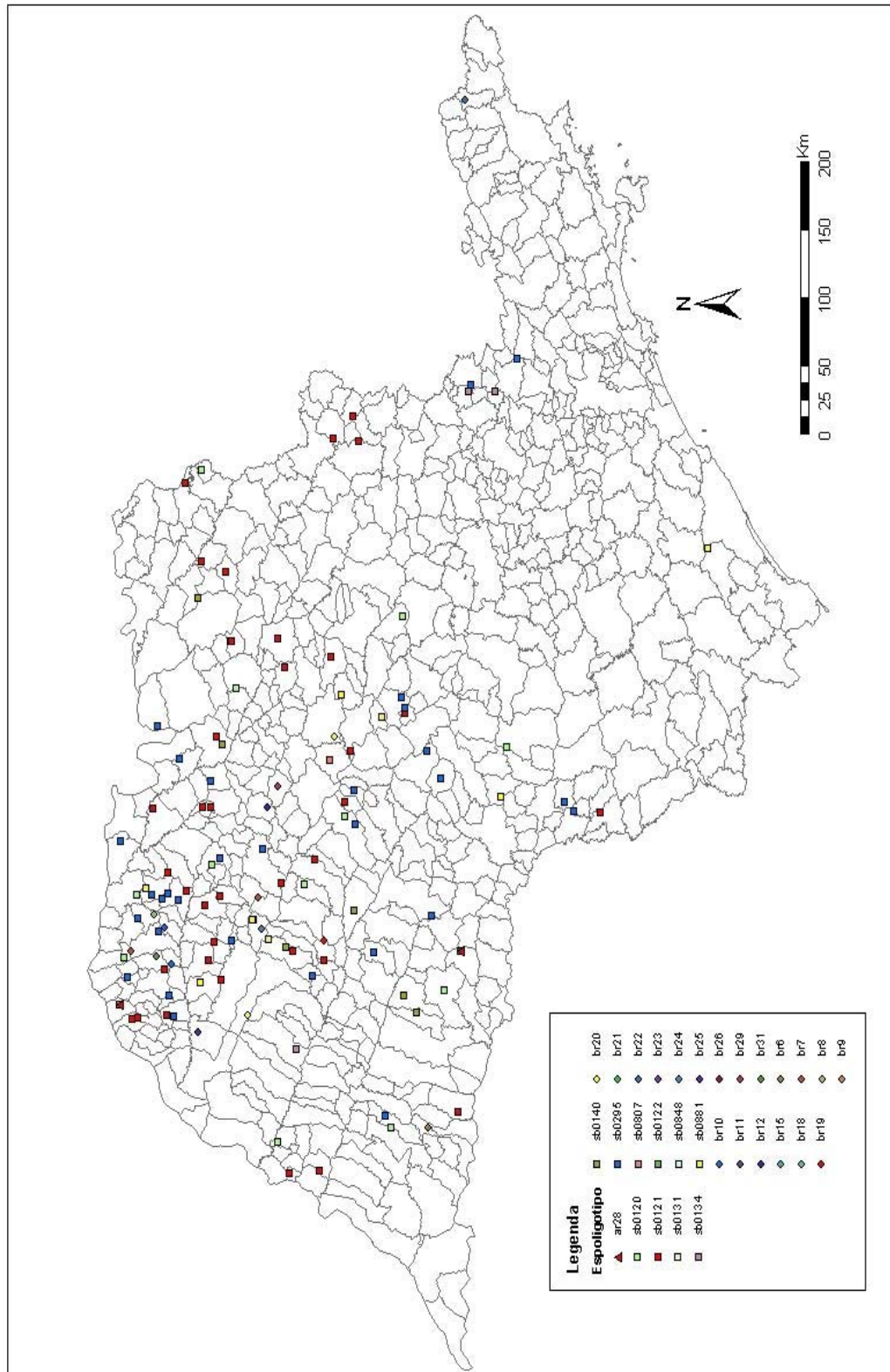


Figura 2. Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, segundo os espoligotipos de *M. bovis* isolados.

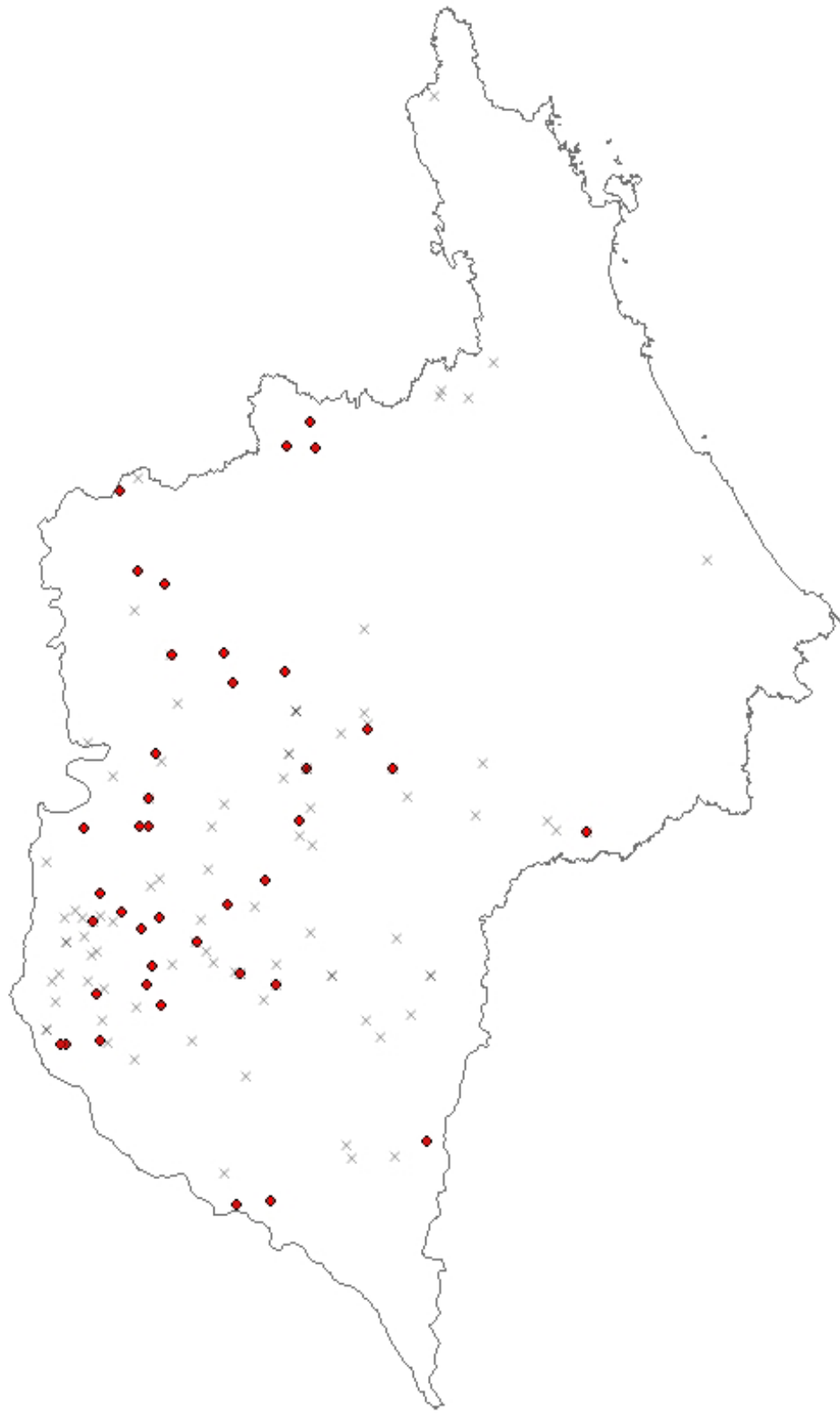


Figura 3: Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, com destaque para o espótipo SB0121.

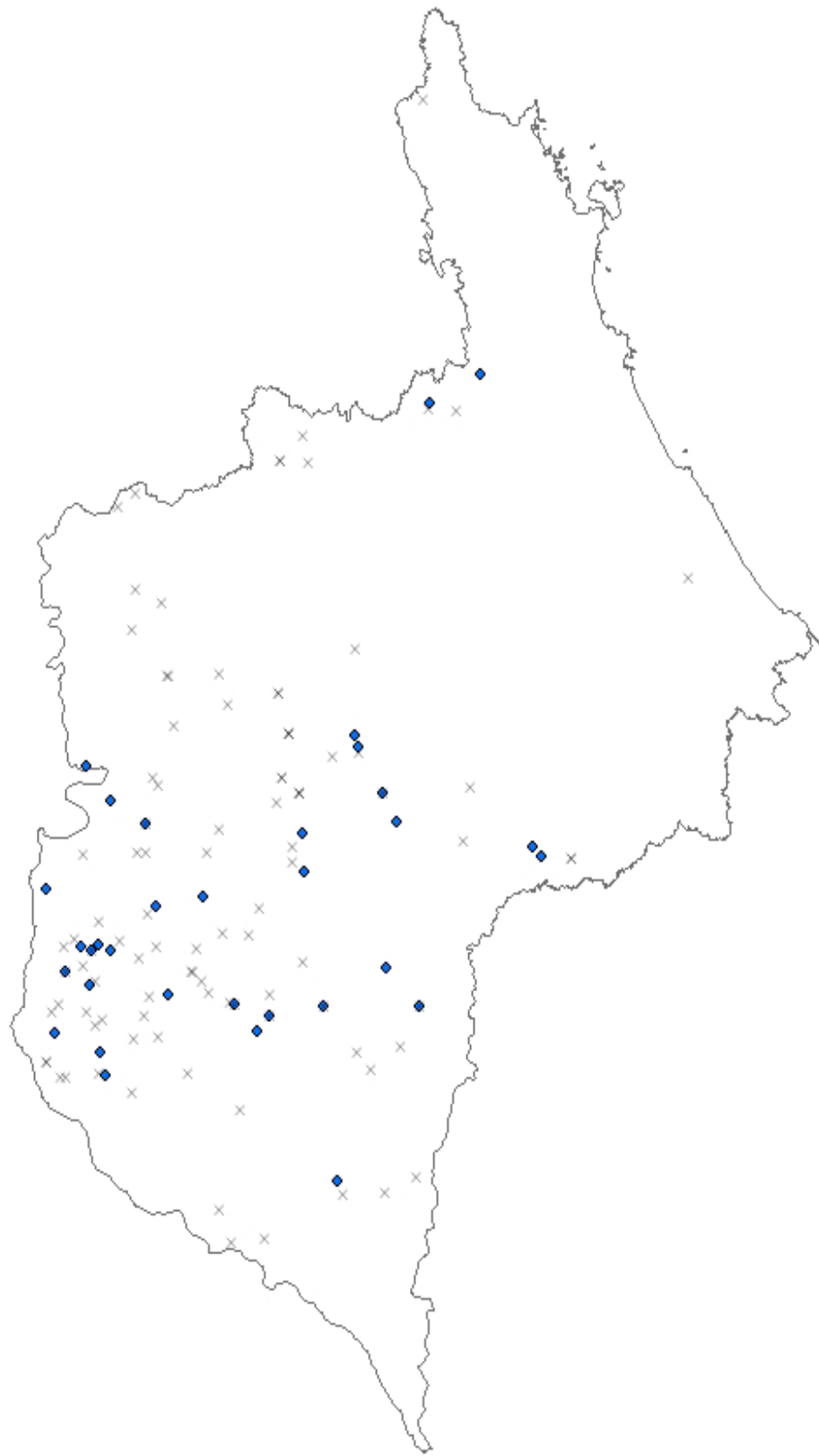


Figura 3: Localização espacial dos focos bacteriológicos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo detectados, com destaque para o espoligotipo SB0295

Gráfico 1: Diferença entre os valores da função K para propriedades foco do espoligotipo SB0121 e foco para qualquer outro espoligotipo em função da distância em metros.

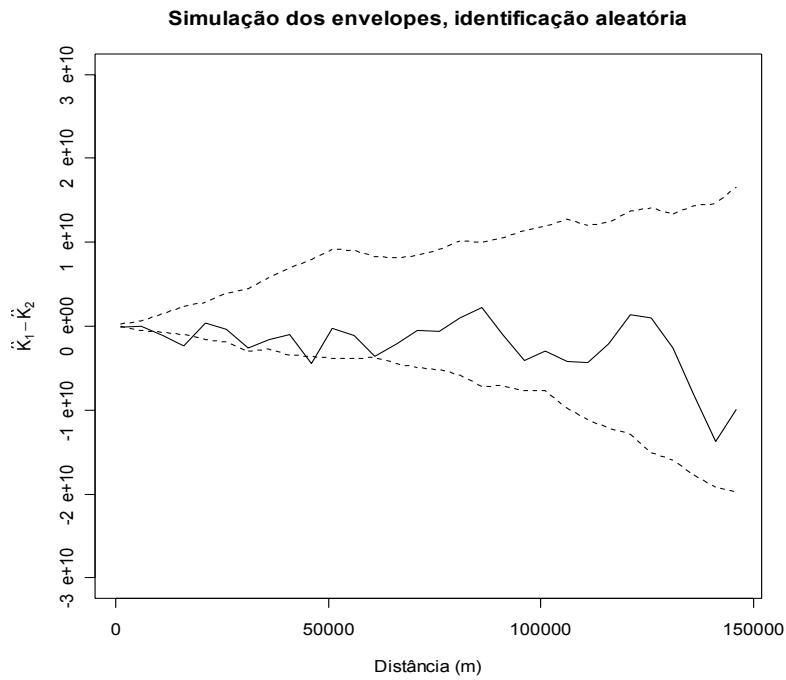
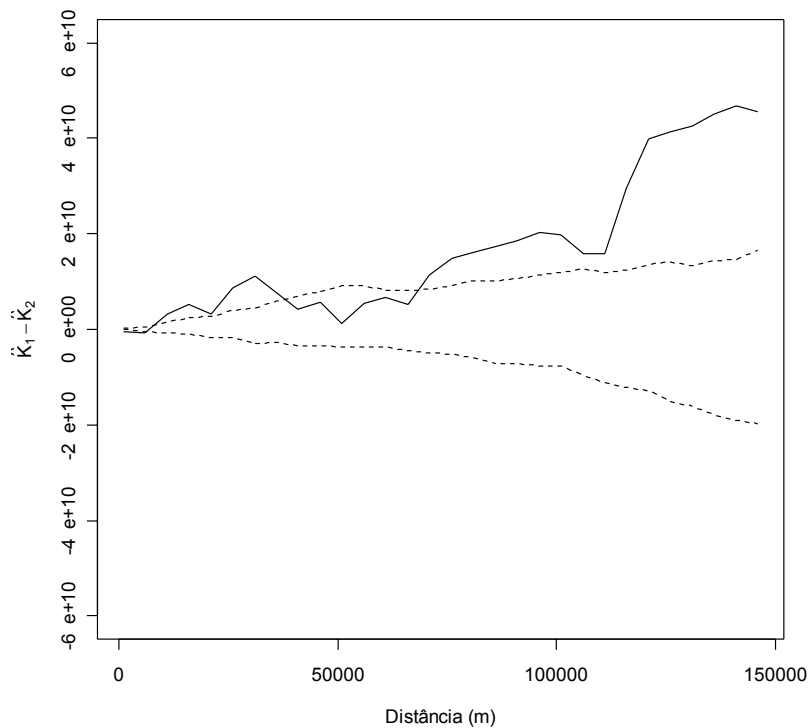


Gráfico 2: Diferença entre os valores da função K para propriedades foco do espoligotipo SB0295 e foco para qualquer outro espoligotipo em função da distância em metros.



3.5 MIRU-VNTR

Como apenas as unidades de criação caracterizadas como foco do espoligotipo SB0295 apresentaram distribuição espacial agrupada, esse espoligotipo foi escolhido para a realização da técnica de MIRU-VNTR. Dos 66 isolados que compuseram o espoligotipo SB0295, 48 delas foram submetidas ao MIRU-VNTR. As Figuras 5 a 9 trazem exemplos de géis nos quais foram observados polimorfismos entre os isolados e a Tabela 1 os resultados consolidados.

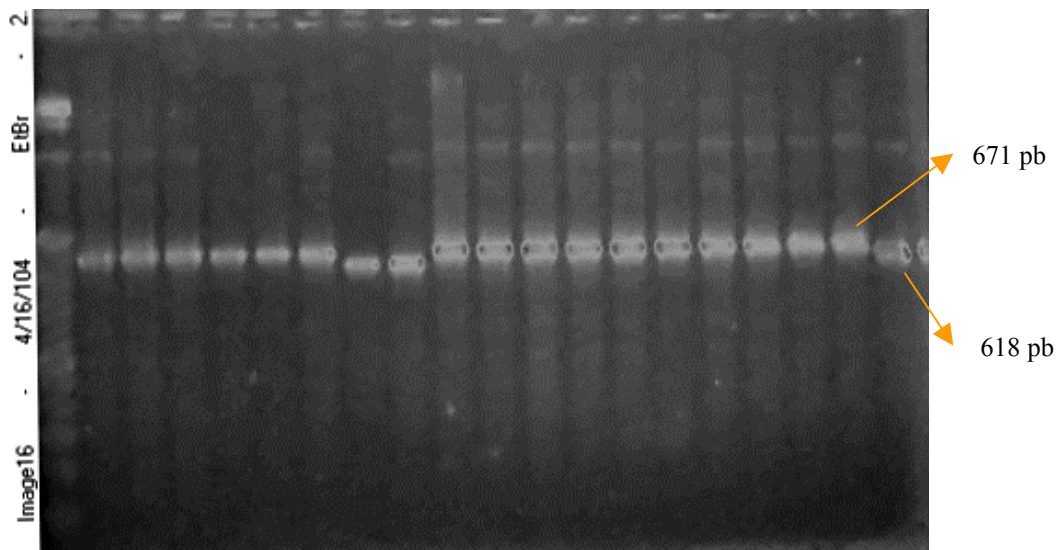


Figura 5: MIRU-VNTR 16, mostrando polimorfismo nas amostras 26, 27 e 38 (da esquerda para direita).

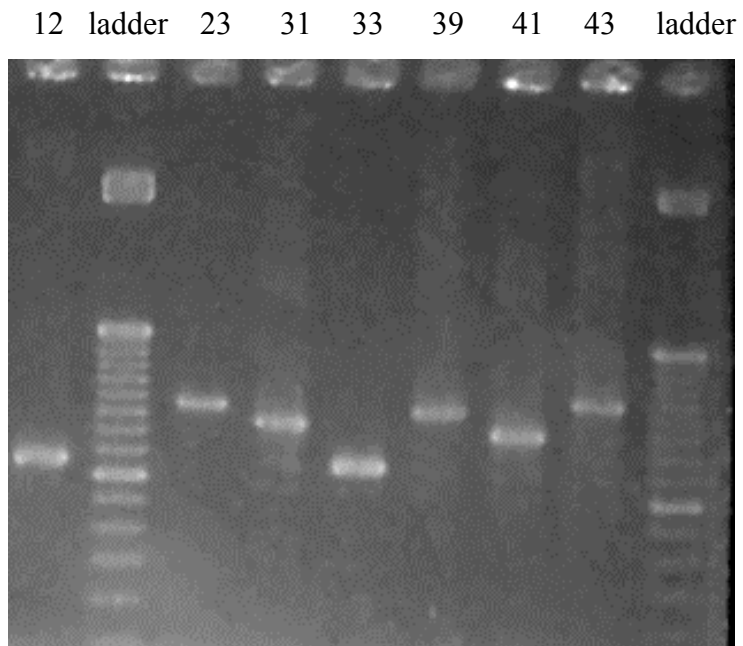


Figura 6: MIRU-VNTR 26, mostrando o padrão de migração em gel das amostras não polimórficas, 31 e 41 (489pb), comparadas as polimórficas 12 (438pb), 23 (540pb), 33 (387pb), 39 (540), e 43 (540pb).

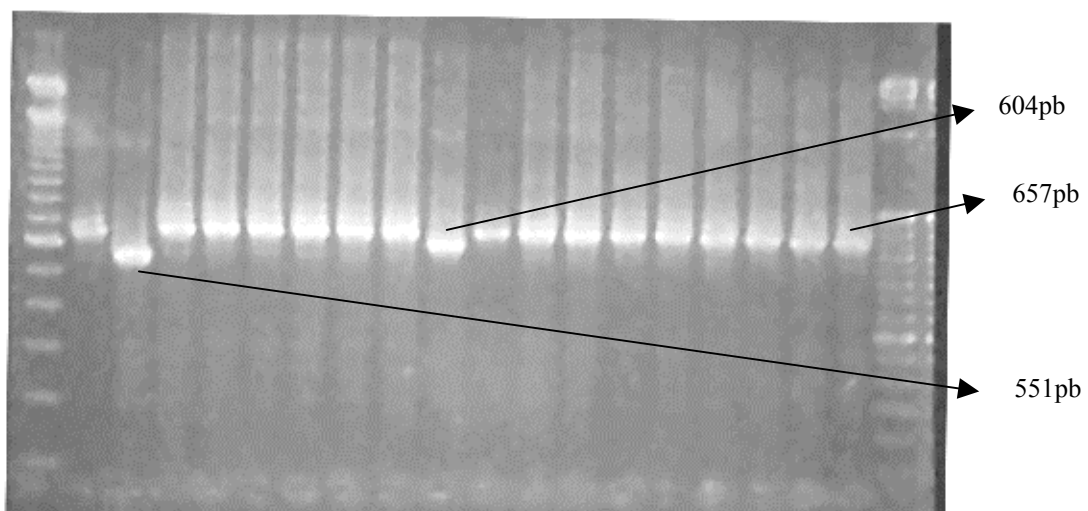


Figura 7: MIRU-VNTR 27, mostrando polimorfismo das amostras 2 e 9 (da esquerda para a direita).

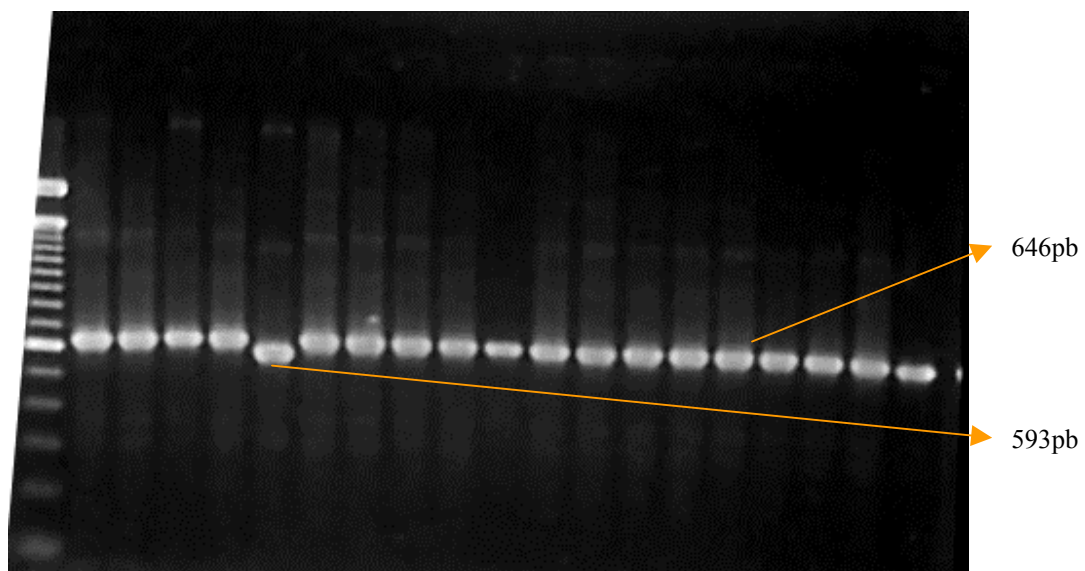


Figura 8: MIRU-VNTR 39, mostrando polimorfismo da amostra 5.

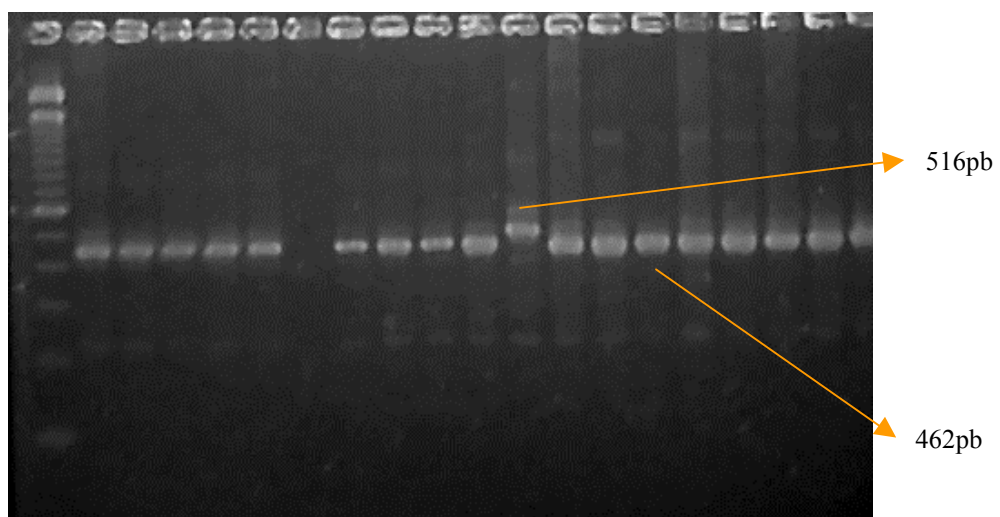


Figura 9: MIRU-VNTR 40, mostrando polimorfismo da amostra 30.

Tabela 1: Resultados do método MIRU-VNTR para 48 isolados de *M. bovis* do Estado de São Paulo, pertencentes ao espoligotipo SB0295.

MIRU Amostra	alelos*										
	2	4	10	16	23	24	26	27	31	39	40
1	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2
2	2	3	2	2	4	2	4	1	3	2	2
3	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
4	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
5	2	3	2	2	4	2	4	3	3	1	2
6	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
7	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
8	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2
9	2	3	2	2	4	2	3	2	3	2	2
10	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
11	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2
12	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2
13	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
14	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
15	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
16	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
17	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
18	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
19	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
20	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
21	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
22	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
23	2	3	2	2	4	2	5	3	3	2	2
24	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
25	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
26	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2
27	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2
28	2	3	2	2	4	2	4	3	3	3	2
29	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
30	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	3
31	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
32	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
33	2	3	2	2	4	2	2	3	3	2	2
34	2	3	2	2	4	2	4	2	3	2	2
35	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
36	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
37	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
38	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2
39	2	3	2	3	4	2	5	3	3	2	2
40	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
41	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2
42	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
43	2	3	2	2	4	2	5	3	3	2	2
44	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
45	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
46	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
47	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2
48	2	3	2	3	4	2	4	3	3	2	2

* conforme www.pnas.org

Os resultados da Tabela 1 mostram que os MIRU 16, 26, 27 39 e 40 foram capazes de diferenciar isolados.

A Tabela 2 reorganiza os resultados do MIRU-VNTR, permitindo visualizar a sua capacidade de discriminação dos 48 isolados classificados como espoligotipo SB0295.

Tabela 2: Resultados do método MIRU-VNTR para 48 isolados de *M. bovis* do estado de São Paulo pertencentes ao espoligotipo SB0295, mostrando a capacidade discriminatória do método, denominada de padrão MIRU.

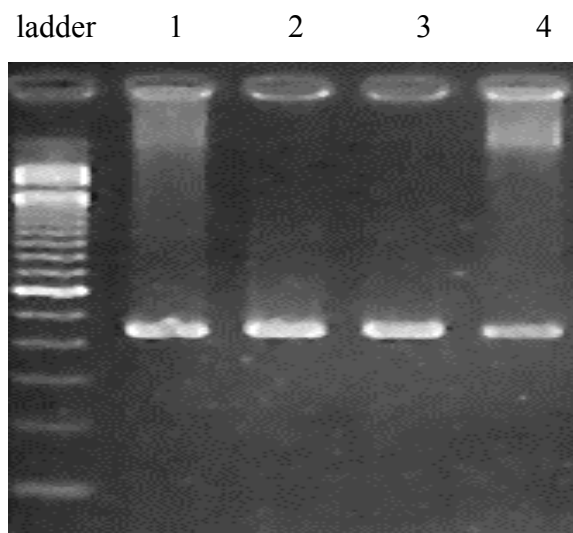
MIRU amostra	alelos*											Padrão MIRU	
	2	4	10	16	23	24	26	27	31	39	40		
3	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2	1	
4	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
6	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
7	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
8	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2		
10	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
13	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
14	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
15	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
16	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
17	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
18	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
19	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
20	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
21	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
22	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
24	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
25	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
29	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
31	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
32	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
35	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
36	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
37	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
40	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
42	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
44	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
45	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
46	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
47	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	2		
48	2	3	2	3	4	2	4	3	3	2	2		2
1	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2		3
11	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2		3
12	2	3	2	2	4	2	3	3	3	2	2		3
2	2	3	2	2	4	2	4	1	3	2	2		4
5	2	3	2	2	4	2	4	3	3	1	2		5
9	2	3	2	2	4	2	3	2	3	2	2		6
23	2	3	2	2	4	2	5	3	3	2	2		7
43	2	3	2	2	4	2	5	3	3	2	2		7
26	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2		8
27	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2		
38	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2		
41	2	3	2	1	4	2	4	3	3	2	2		
28	2	3	2	2	4	2	4	3	3	3	2		9
30	2	3	2	2	4	2	4	3	3	2	3		10
33	2	3	2	2	4	2	2	3	3	2	2		11
34	2	3	2	2	4	2	4	2	3	2	2		12
39	2	3	2	3	4	2	5	3	3	2	2		13

* conforme www.pnas.org.

3.6 PCR-PRA

Os 47 isolados BAAR que não apresentaram hibridização na membrana de *spoligotyping* foram submetidas ao PCR-PRA. Esses isolados foram numerados de 1 a 47 e 14 deles foram identificados pela técnica como sendo *M. avium* tipo I. Os 33 isolados restantes apresentaram resultados inconclusivos à técnica PCR-PRA. Segue uma seqüência de figuras mostrando a amplificação obtida nas eletroforeses em gel de agarose das amostras testadas:

Figura 10: PRA-PCR, mostrando amplificação de fragmento de 439pb para as amostras de 1 a 4.



3.7 Análise do banco de dados

As informações inseridas no banco de dados permitiram a realização de análises descritivas. As Tabelas 3 a 5 dizem respeito às informações constantes das guias acompanhatórias (anexo 1) das amostras colhidas em abatedouro.

Tabela 3: Valores preditivos do diagnóstico realizado pelos inspetores de carnes das estruturas SIF e SISP.

serviço de inspeção de carnes	SIF	SISP
número amostras coletadas	437	141
número amostras processadas	437	141
número de isolados de <i>M. bovis</i>	156	92
valor preditivo positivo do diagnóstico em matadouro	0,36	0,64

Somando-se 437 (coletadas pelo SIF) com 141 (coletadas pelo SISP) resulta 578, número diferente de 588, total de amostras processadas, conforme consta no Quadro 2. Essa diferença é decorrência de 10 amostras terem sido encaminhadas e processadas, porém com as guias acompanhatórias incorretamente preenchidas.

Tabela 4: Distribuição das lesões na carcaça, segundo o resultado dos exames bacteriológicos.

resultado bacteriológico distribuição das lesões nas carcaças	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>	
	número	%	número	%
Trato Respiratório	122	40,8	145	47,7
Trato Digestivo	82	27,4	85	28,0
Genito Urinário	3	1,0	0	0,0
Linfonodos da cabeça e pescoço	90	30,1	72	23,7
Úbere	2	0,7	2	0,7
TOTAL	299		304	

Tabela 5: Características dos animais condenados em matadouro por tuberculose, segundo os resultados bacteriológicos.

resultado bacteriológico características dos animais	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>		VPP*
	Número	%	número	%	
Sexo					
Macho	95	38,9	166	51,1	0,36
Fêmea	149	61,1	159	48,9	0,48
Total	244		325		
Raça					
Outras raças	26	10,6	72	21,8	0,26
Zebu	75	30,5	130	39,3	0,37
SRD	111	45,1	116	35	0,49
Europeu corte	8	3,3	5	1,5	0,61
Europeu leite	26	10,6	8	2,4	0,76
Total	246		331		
Idade					
até 12 meses	0	0	1	0,3	0,0
12 a 24 meses	12	4,9	19	5,8	0,39
24 a 32 meses	78	31,7	107	32,8	0,42
mais que 36 meses	156	63,4	199	61	0,44
Total	246		326		

* Valor Preditivo Positivo

Tabela 6: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a tipologia da exploração.

resultado bacteriológico tipo das propriedades	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>		VPP*
	Número	%	número	%	
corte	80	56,7	147	71	35,2
mista	50	35,5	53	25,6	48,5
leite	11	7,8	7	3,4	61,1
TOTAL	141		207		

* Valor Preditivo Positivo

Tabela 7: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo o número de animais.

resultado bacteriológico número de animais por propriedade	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>		VPP*
	número	%	número	%	
1 a 20	2	1,8	11	4,6	0,15
21 a 100	32	28,6	46	19,4	0,41
mais que 100	78	69,6	180	76	0,30
TOTAL	112		237		0,32

* Valor Preditivo Positivo

Tabela 8: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a origem dos animais introduzidos.

resultado bacteriológico de quem a propriedade compra animais	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>	
	número	%	número	%
de exposição	3	1,8	7	3,1
de leilão/feira	37	22,0	51	22,6
de comerciante de gado	44	26,2	44	19,5
diretamente de outras fazendas	84	50,0	124	54,9
TOTAL	168		226	

Os dados da Tabela 8 mostram que as propriedades foco introduzem animais preferencialmente comprando-os diretamente de outras fazendas e que os comerciantes de gado, grandes difusores de doença, aparecem em segundo lugar.

Tabela 9: Características das propriedades focos de tuberculose bovina, segundo a prática de venda de animais.

resultado bacteriológico como a propriedade vende animais	isolamento de <i>M. bovis</i>		não isolamento de <i>M. bovis</i>	
	número	%	número	%
em exposição	0	0	0	0
em leilão/feira	15	19,2	26	27,7
para comerciante de gado	41	52,6	33	35,1
diretamente para outras fazendas	22	28,2	35	37,2
TOTAL	78		94	

4 DISCUSSÃO

Como os resultados obtidos por Ambrosio et al., (2004) mostraram que o método HPC é mais sensível que o Petroff, optamos por submeter ao HPC todas as amostras que resultaram negativas ao isolamento de BAAR pelo método Petroff. Isso significou um aumento de 19% na obtenção de isolados BAAR, passando de 248 para 295. Além disso, é importante adicionar que é mais simples realizar o método HPC, pois prescinde da fase de neutralização, indispensável ao método de Petroff.

Os 295 isolados BAAR foram submetidos ao *spoligotyping* e 248 deles foram identificados como *M. bovis*. Como além de identificar as espécies do complexo *M. tuberculosis* essa técnica também os discrimina em espoligotipos, esses 248 isolados de *M. bovis* foram discriminados em 33 diferentes espoligotipos, 13 deles já descritos pela literatura internacional (205 isolados) e 20 ainda inéditos (43 isolados) (Quadro 4).

Os espoligotipos SB0295 (27,4%) e SB0121 (26,6%), 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 e SB0121 na Holanda e Aranaz et al., (1996) na Espanha.

O terceiro espoligotipo mais freqüentemente isolado no presente estudo, SB0120 (8,9%), que também é denominado de BCG-like (HADDAD *et al.* 2001), parece ter grande diversidade de hospedeiros, pois, além de bovinos, já foi isolado de cabras, ovelhas, suínos e animais silvestres. Ainda, parece estar bastante disseminado, pois além de ser o mais freqüente na França (26%), também já foi encontrado na Bélgica, Itália, Tunísia, China, Dinamarca, Iran, Japão, Portugal, Rússia, África do Sul, Espanha,

Sri Lanka e Holanda (www.mbovis.org). Gibson et al., (2004) relataram 50 casos de tuberculose humana por *M. bovis*, surgidos entre 1997 a 2000 no Reino Unido, sendo 2 deles provocados pelo SB0120.

O quarto espoligotipo mais freqüentemente isolado no presente estudo, SB0881 (7,7%), pelos dados disponíveis até o momento, parece ser pouco disseminado, pois foi encontrado apenas na França (HADDAD et al., 2001).

O espoligotipo SB0140, quinto mais freqüente no presente estudo (6% dos isolados), parece estar bastante difundido no cone sul da América Latina. Foi descrito como majoritário na Argentina e presente no Paraguai e Uruguai (ZUMARRAGA et al., 1999b). Curiosamente, os mesmos autores, apesar de terem analisado 23 isolados brasileiros na mesma ocasião, inclusive do Estado de São Paulo, não referiram a presença desse espoligotipo no Brasil. Esse espoligotipo também já foi descrito na Europa. Malone et al., (2003), estudando surto de tuberculose ovina na Irlanda, isolaram o SB0140 desses animais. Gibson et al., (2004) relataram 50 casos de tuberculose humana por *M. bovis*, surgidos entre 1997 a 2000 no Reino Unido, sendo 15 deles provocados pelo SB0140.

Dentre os espoligotipos já descritos, o sexto mais freqüentemente isolado no presente estudo, SB0134 (2,4%), pelos dados disponíveis até o momento, foi relatado apenas por Gibson et al., (2004), em um caso de tuberculose humana, dentre 50 surgidos entre 1997 a 2000 no Reino Unido.

Dentre os espoligotipos já descritos, o AR28 e o SB0122 ocuparam a sétima posição em freqüência de isolamentos no presente estudo (0,8%, 2 isolados para cada). O AR28 já foi descrito em bovinos do Brasil e Argentina (ZUMARRAGA et al., 1999b) e o SB0122 em bovinos da Holanda (www.mbovis.org).

Finalizando a análise dos espoligotipos já descritos, do SB0131, SB0848,

SB0807, SB0288 e SB0268, no presente estudo foi obtido apenas um isolado de cada. O SB0131 já foi encontrado em bovinos da Argentina (KREMER et al., 1999) e em dois humanos no Reino Unido (GIBSON, et al., 2004). HADDAD et al., (2001) relataram o SB0848 em bovinos da França e o SB0268 em bovinos da Inglaterra. O SB0807 e o SB0288 foram encontrados em bovinos da Holanda(www.mbovis.org).

Relativamente aos novos espoligotipos, encontrados no presente estudo e até o momento não reportados, sempre denominados pelas iniciais BR, importante ressaltar que 11 deles foram isolados únicos (0,4%), ou seja, foi obtido apenas um isolado de cada um. São: BR9, BR12, BR18, BR21, BR22, BR23, BR25, BR26, BR29, BR31, e BR32.

Em ordem decrescente, foram obtidos 6 isolados do espoligotipo BR19 (2,4%), cinco isolados de cada um dos BR10 e BR20 (individualmente 2%), 4 isolados do BR7 (1,6%), 3 isolados de cada um dos BR6 e BR15 (individualmente 1,2%) e 2 isolados de cada um dos BR8, BR11 e BR24 (individualmente 0,8%).

Estes resultados mostram que existem no Brasil espoligotipos que parecem, até o momento, ser compartilhados entre Brasil, Europa, Ásia, Oriente e África (SB0120), entre Brasil, América Latina e Europa (SB0140, SB0131 e AR28), entre Brasil e Europa (SB0295, SB0121, SB0881, SB0134, SB0122, SB0848, SB0807 e SB0288), demonstrando relações epidemiológicas entre o Brasil e estas 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 valorosa 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.

Combinando os resultados do Quadro 4 aos do dendograma (Figura 1), verifica-se que o espoligotipo SB0121, o mais freqüentemente isolado no presente estudo (27,4%), apresenta grande homologia da região *IS* 6110 com o SB0120 (BCG, 8,9% dos isolados), sendo que difere desse último apenas na deleção do espaçador número 21. Fato semelhante ocorre com o espoligotipo SB0295 (26,6% dos isolados), que difere do SB0120 (BCG) nos espaçadores 21 e 37. Além disso, um fato curioso é que o quarto espoligotipo mais freqüentemente isolado, o SB0881 (7,7%), está geneticamente bastante distante dos citados acima e apresenta deleção dos espaçadores 21, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 em relação ao SB0120. O espoligotipo SB0140, o mais freqüente na Argentina e o quinto mais freqüentemente isolado nesse estudo (6,0%), também encontra-se geneticamente distante do SB0120, diferindo desse na deleção dos espaçadores 8, 9, 10, 11 e 12.

Em relação aos novos espoligotipos, denominados BR, verifica-se que o mais freqüentemente isolado, BR19 (2,4%), é bastante semelhante ao SB0140, diferindo desse último apenas na deleção do espaçador 34. O BR20 guarda grande homologia com o SB0121, diferindo desse apenas na deleção do espaçador 4. O fato mais curioso em relação aos novos espoligotipos é que o BR7 (1,6% dos isolados), no dendograma (Figura 1) mostra-se em chave distinta de todos os demais espoligotipos isolados, diferindo do SB0120 na deleção dos 11 primeiros espaçadores.

Os resultados bacteriológicos, clássicos e moleculares, foram à base sobre a qual se desencadearam as ações de rastreamento dos focos de tuberculose bovina. Não foi possível rastrear todos os focos detectados pelo sistema. Ao todo, foram rastreados 144 focos e foram escolhidos os dois espoligotipos mais freqüentes para a realização das análises espaciais.

Nos gráficos 1 e 2, o interior das linhas pontilhadas delimita a área onde o comportamento da curva K_1 - K_2 não mostra a formação de agrupamento. A curva K_1 - K_2 para o espoligotipo SB0121 ultrapassa a linha pontilhada inferior em alguns pontos e isso indica a formação de agrupamento, porém para o grupo controle. Já a mesma curva para o espoligotipo SB0295 ultrapassa a linha pontilhada superior, indicando que o mesmo forma agrupamento. Isso significa que apenas o SB0295 apresenta uma distribuição espacial agrupada.

Portanto, seria interessante descobrir a razão desse agrupamento, o que pode ser feito através de investigação de campo para procurar relações epidemiológicas entre esses focos de SB0295. Do ponto de vista operacional essa investigação tem por objetivo individualizar os grandes focos difusores do espoligotipo, saneá-los, e assim impactar de maneira importante à velocidade de espalhamento da doença na área. Os grandes difusores podem ser comerciantes de gado, propriedades infectadas que vendem genética, etc.

Embora o *spoligotyping* tenha apresentado uma boa discriminação dos isolados de *M. bovis* do Estado de São Paulo (33 espoligotipos-Quadro 4), permitindo a realização de análises epidemiológicas de agrupamentos (Figuras 3 e 4, Gráficos 1 e 2), situação de tamanha diversidade pode não se apresentar em outras ocasiões, onde faria-se necessária uma discriminação ainda maior. Para explorar essa possibilidade foi escolhido o espoligotipo que se apresentou na forma agrupada (SB0295). Pelo MIRU-VNTR, o esse espoligotipo foi re-discriminado em 13 diferentes estirpes de *M. bovis*. Os métodos de discriminação molecular de isolados de uma mesma espécie deve ser escolhida, portanto, tendo em mente o problema que se quer resolver. Por vezes, faz-se necessária a utilização de determinada ferramenta, como no caso dos MIRU para a identificação de micobactérias MDR (*Mycobacterium Drug Resistance*) associados ao

HIV (*human immunodeficiency syndrome*) (SUPPLY et al., 2001; GASCOYNE-BINZI et al., 2001; SUPPLY et al., 2000).

Para os resultados obtidos no presente projeto, parece que a técnica de *spoligotyping* produz uma suficiente diversidade de *M. bovis*. Porém, pode ser que em determinada região, ainda desconhecida dentro do Estado de São Paulo, a técnica de *spoligotyping* seja insuficiente, pois essa região é acometida por um único espoligotipo. Nesse caso faria-se necessária a agregação de uma capacidade discriminatória maior que, como mostram os resultados da Tabela 2.

Comparando-se as duas técnicas do ponto de vista operacional, verifica-se que o *spoligotyping* tem a vantagem de permitir a análise contemporânea de 45 isolados por membrana, obtendo-se o resultado em 12 horas. Como desvantagem, o *spoligotyping* necessita de forno de hibridização, membranas produzida por uma única empresa e sistema de revelação específico. A técnica de MIRU-VNTR tem como vantagem uma capacidade discriminatória maior que o *spoligotyping* e como desvantagem necessitar de vários *primers*, com diferentes protocolos de amplificação para análise de uma única amostra.

Dos 295 isolados BAAR, os 47 que não apresentaram hibridização na membrana de *spoligotyping* foram submetidas ao PCR-PRA. Apenas 14 deles foram identificados pela técnica como sendo *M. avium* tipo I. Os restantes apresentaram resultados inconclusivos e merecerão análises ulteriores. Portanto, isso confirma a infecção de bovinos do Estado de São Paulo por MAC e reforça a importância da utilização de teste tuberculínico de alta especificidade, ou seja, o teste cervical comparativo, nas ações de certificação de propriedades livres ou monitoradas (Acha e Zyffres, 2001).

Seguem os comentários das análises das guia acompanhatórias das amostras coletadas em abatedouros e dos questionários epidemiológicos

realizados nos focos rastreados a partir do resultado da condenação a carcaça em abatedouro.

Os resultados da Tabela 3 indicam que na rede SISP, de cada 100 animais condenados por tuberculose, 64,5 deles estão realmente infectados, enquanto na rede SIF esse valor é de apenas 35,7. Isso se explica pela diminuição do valor preditivo do teste positivo conforme decresce a prevalência real da doença. Isso significa que, em tese, essa diferença se justifica, pois na rede SIF a prevalência real da tuberculose é pequena, visto que abate quase que exclusivamente gado de corte, de criação extensiva, onde a tuberculose não se transmite com facilidade e, portanto, a expectativa é que tenha ocorrência esporádica. Cenário oposto ocorre na rede SISP, que abate os descartes das pequenas propriedades de aptidão leiteira ou mista, onde a expectativa de prevalência da tuberculose é maior. Isso poderá ser confirmado caso tenhamos acesso à prevalência de condenações por tuberculose nas duas redes de inspeção para o período de coleta de cada uma.

Os dados constantes da Tabela 4 desprezaram as lesões relatadas nos questionários como “outros”, onde não existe a informação sobre os órgãos afetados. Além disso, o número total de 299 para casos onde houve isolamento de *M. bovis* difere dos 248 isolados esporigotipados de *M. bovis*. Isso decorre do fato de haver carcaças com lesões em mais de um conjunto. Feitas essas ressalvas, nota-se que há um predomínio de lesões macroscópicas no trato respiratório, seguido linfonodos da cabeça e pescoço e trato digestivo. Chama a atenção a alta frequência de lesões trato digestivo, e isso pode significar que talvez essa porta de entrada seja mais importante do que temos imaginado na transmissão da tuberculose no Estado de São Paulo. Também é interessante notar que o padrão de distribuição das lesões nas carcaças é bastante semelhante para animais infectados

e não infectados. Essa igual distribuição das lesões pode significar baixa sensibilidade da técnica de isolamento. O exame histológico, incompatível com o sistema de coleta que idealizamos no presente projeto, poderia auxiliar na maior precisão do diagnóstico.

Os dados da Tabela 5 indicam que os bovinos tuberculosos do Estado de São Paulo são preferencialmente fêmeas, SRD e com idade superior a 36 meses, indo de encontro às expectativas, visto que fêmeas têm uma vida produtiva mais longa, significando maior chance de infectarem-se por doença crônica, caso da tuberculose. Apesar do exame de uma única lesão coletada não ser o critério ideal de classificação do estado sanitário de um animal, os resultados dos valores preditivos positivos apresentam valores consistentes com a epidemiologia da doença, apresentando valores mais elevados para fêmeas européias com mais de 36 meses.

Os dados da Tabela 6 indicam que a tuberculose bovina é mais freqüente em propriedades tipo corte e mista. Esse dado tem que ser analisado com muito cuidado, pois o sistema de revelação de focos apoiou-se no abatedouro, e sabe-se que existe grande fuga de abatedouros com inspeção por parte das propriedades leiteiras, onde provavelmente a doença ocorra com maior freqüência (BELCHIOR, 2000). Portanto, os dados da Tabela 6 podem estar nos informando que a vigilância em abatedouro não é muito eficiente para individualizar focos de tuberculose nas propriedades de leite e teria que ser acompanhado por ações que incluam essas propriedades na rede formal de abate de animais. Feitas as mesmas ressalvas do parágrafo anterior relativas ao cálculo dos valores preditivos positivos, verifica-se que esses resultados não surpreendem e são consistentes com

as expectativas, mostrando os seguintes valores: leite (61,1%), mista (48,5%) e corte (35,2%).

Os dados da Tabela 7 indicam que a maioria dos focos têm mais de 100 animais. Na menor propriedade havia 10 animais e na maior 4.138. Apenas 3 propriedades tinham mais de 1.000 animais. O fato da maioria dos focos serem propriedades médias ou grandes provavelmente está relacionado ao fato da amostra examinada sofrer uma forte influência do sistema de coleta, que teve alto peso ponderal do sistema SIF, que abate principalmente bovinos de corte, onde a expectativa de prevalência real é menor.

Os dados da Tabela 8 mostram que as propriedades foco introduzem animais preferencialmente comprando-os diretamente de outras fazendas e que os comerciantes de gado, grandes difusores de doença, aparecem em segundo lugar. Os dados da Tabela 9 mostram que as propriedades foco vendem animais preferencialmente para comerciantes, reforçando o comentário do parágrafo anterior. Resumindo, a comercialização, tanto para introdução quanto para saída de animais de propriedades foco é feita de maneira aparentemente desprovida de cuidados sanitários, facilitando a difusão da doença.

5 CONCLUSÕES

1. Foram identificados 33 diferentes espoligotipos dentro dos 248 isolados de *M. bovis* de bovinos no Estado de São Paulo. Desses, quarenta e oito espoligotipos SB0295 foram re-discriminados em 13 novos perfis genéticos de *M. bovis* pela técnica MIRU-VNTR.
2. Dentre os dois espoligotipos mais prevalentes estudados (SB0295 e SB0121), apenas o SB0295 apresentou-se de forma agrupada nas análises espaciais.
3. Foram geradas várias informações sobre a tipologia e o manejo das unidades de criação de bovinos caracterizadas como focos de tuberculose.
4. A atual infra-estrutura existente no Estado de São Paulo foi capaz de operar um sistema de detecção de focos de tuberculose bovina.

6 REFERÊNCIA

ACHA, P.; N. & ZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales**. Washington: Tercera Edición. Organización Panamericana de la Salud, 2001. p. 266-283.

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E.M.D.; ROSALES; C.A.R; FERREIRA NETO; J.S.N; AMAKU,M. Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação. 17^a Reunião Anual do Instituto Biológico **Anais...** v.1 RAIB, 2004.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZOLEZ, O; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BUNSCHOTEN, A . E.; van EMBDEN, J. D.; COUSINS, D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.11, p.2734-40, 1996.

BAILEY, T.; GATRELL, A.C. **Interactive spatial data analysis**. Harlow: Prentice Hall, 1995, 413p.

BARKSDALE, L.; KIM, K. Mycobacterium. **Bacteriological Reviews**, v.41, p.217-372, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Departamento de Defesa Animal Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** (PNCEBT).
<<http://www.agricultura.gov.br/das/dda/in00.htm>> Acesso em: janeiro 2001)

BREMER-MELHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of Mycobacterium tuberculosis for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.7, p.2350-2351, 1999.

BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. Tese (mestrado) - Universidade Federal

de Minas Gerais, Belo Horizonte. Área de concentração: Medicina Veterinária, 2000.

BROWN, W. H.; HERNANDEZ DE ANDA, J. Tuberculosis in adult beef cattle of mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n.4, p. 557-559, 1998.

CARPENTER, T.E. Methods to investigate spatial and temporal clustering in veterinary epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v.48, n.4, p.303-320, 2001.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnóstico de laboratório de la tuberculosis animal**. Buenos Aires, 1972. 48p. (Nota tecnica, 26).

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Metodos de laboratório de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identificacion de micobacterias**. Buenos Aires, 1973. 48p. (Série de monografias cientificas y tecnicas, 6).

CORNER, L. A; TRAJSTAMAN, A.C. An Evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a Decontaminant in the Primary Isolation of Mycobacterium bovis from Bovine Lesions. **Veterinary Microbiology**, n. 18, p. 127-134, 1988.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.

COUSINS, D.; WILLIAMS, S.; LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; BUNSCHOTEN, vAN EMBDEN, J. V.; ELLIS, T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.168-78, 1998.

COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R. Use of DNA amplification

for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.27, p.187-95, 1991.

DIEFFENBACH, C. W.; DRAGON, E. A.; DVEKSLER, G.S. Setting up a PCR laboratory. In: PCR primer: a laboratory manual. **New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995**. p. 7-16

DOLPHIN, P. J.; RAVIGLIONE, M. C.; KOCHI, A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bulletin of the World Health Organization**. n.72, v.2, p.213-220, 1994.

ELLIOT, P.; CUZICK, J.; ENGLISH, D.; STERN, R. **Geographical & environmental epidemiology**. Oxford: Oxford University Press, 1992. 382p.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, p.1643-51, 1991.

ESRI INC. **ArcView GIS version 3.1**. Redlands, 1996 1 CD-Rom.

ESSEY, M. A. Status of bovine tuberculosis in North America. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.15-22, 1994.

FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; FIASCHITELLO, A.M.G.P.; BALIAN, S.C.; FAGGIN, G.; FARINA, L. Andamento de la tubercolosi bovina in Brasile. **Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale**, v.91, n.1, p.31-41, 1997.

FROTHINGHAM R, MEEKER-O'CONNELL W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology**, v.144, p.1189-1196, 1998.

GASCOYNE-BINZI. D. M.; BARLOW R. R. E. L.; FROTHINGHAM. R.; ROBINSON. G.; COLLYNS. T. A.; GELLETLIE. R.; HAWKEY. P. Rapid Identification of Laboratory Contamination with mycobacterium tuberculosis Using Variable Number Tandem Repeat Analysis. **Clinical Microbiology**. v. 39, n.1, p.69-74, 2001.

GENEWEIN, A.; TELENTI, A.; BERNASCONI, C.; MORDASINI, C.; WEISS, S.; MAURER, A.; RIEDER, H. L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. **The Lancet**, v.342, p.841-4, 1993.

GOBSOM. A. L.; HEWINSON. G.; GOODCHILD. T.; WATT. B.; STORY. A.; INWALA. J.; DROBNIEWSKI. F. Molecular Epidemiology of Disease Due to Mycobacterium bovis in Humans in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n.1, p.431-434, 2004.

GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D.; KWOH, D. Y.; GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.235-251, 1990.

GORDON, S. F.; BROSCHE, R.; BILLAULT, A.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; COLE, S. T. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, n.3, p. 643-655, 1999.

GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; van SOOLINGEN, D.; van EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; Application for strain differentiation by a novel method. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

HADDAD, N., OSTYN, A., KAROUI, C., MASSELOT, M., THOREL, M. F., HUGHES, S. L., INWALD, J., HEWINSON, R. G. & DURAND, B. Spoligotype Diversity of Mycobacterium bovis Strains Isolated in France from 1979 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3623-3632, 2001

HERMANS, P. W. M.; van SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; de HAAS, P. E. W.; DALE, J. W.; van EMBDEN, J. D. A. The insertion element IS 987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* Complex strains. **Infection and Immunity**, v.59, p. 2695-705, 1991.

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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n.6, p. 709-711, 1997. * errata no v.211, n.12, p.1576, 1997.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing system: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.2465-66, 1988.

JEFFREYS, A. J.; MACLEOD, A.; TAMAKI, K.; NEIL, D. L.; MONCKTON, D. G. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. **Nature**, v.354, p. 204-209, 1991.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.907-14, 1997.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, RHAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2607-18, 1999.

MALONE, F. E.; WILSON, E. C.; POLLOCK, M. J.; SKUCE, R. A. Investigation into an Outbreak of Tuberculosis in a Flock of Sheep in Contact with Tuberculous Cattle. **Journal Veterinary Med.** B50, 500-504, 2003.

McGINN III, T. J.; COWEN, P.; WRAY, D. W. Geographic information systems for animal health management and disease control. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.209, n.11, 1996.

MULLIS, K., B. The unusual origin of polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, p.56-65, 1990.

PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1281-5, 1991.

PRITCHARD, D. G. A Century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v.99, p.357-99, 1988.

RITACCO, V.; KANTOR, I. N. Zoonotic tuberculosis in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3299-3300, 1992.

RICHARDS, W. D.; WRIGHT, H. S. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n.3, p.393-395, 1983.

ROMANO, M. I.; ALITO, A.; FISANOTTI, J. C.; BIGI, F.; KANTOR, I.; CICUTA, M. E.; CATALDI, A. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.50, p.59-71, 1996.

SALAMON, H.; SEGAL, M. R.; PONCE-DE LEON, A.; SMALL, P. M. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular

fingerprints. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.159-68, 1998.

SANSO, R. L.; PFEIFFER, D. U.; MORRIS, R. S. Geographic information systems: their application in animal disease control. **Revue scientifique et technique** v.10, n.1, p.179-95, 1991.

SAKAMOTO, S. M. **Tipificação de Mycobacterium bovis por spoligotyping e por análise de número variável de repetições seriadas (VNTR).**[Strain typing of Mycobacterium bovis by spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats]. São Paulo, 2001. 47 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automates High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p.3563-3571, 2001.

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.

SPSS INC. **SPSS base 9.0 user`s guide**. Chicago: SPSS Inc., 1999a. 740 p.

SPSS INC. **SPSS base 9.0**. Chicago, 1999b 1 CD-Rom.

SZEWZYK, R.; SVENSON, S. B.; HOFFNER, S. E.; BÖLSKE, G.; WAHLSTRÖM, H.; ENGLUND, L.; WNGVALL, A.; KÄLLENIUS, G. Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in humans and Animals in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3183-5, 1995.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.175-8, 1993.

TWEDDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.23-40, 1994.

van EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.406-9, 1993.

van EMBDEN, J. D. A. ; SCHOULS, L. M.; van SOOLINGEN, D. V. Molecular techniques: applications in epidemiologic studies. *In*: THOEN, C.; STEELE, J. H. (ed.) ***Mycobacterium bovis* infection in animals and humans**. Iowa, Iowa State University Press, 1996. p. 15-27.

Website hosts the Mycobacterium bovis Spoligotype Database.
<<http://www.mbovis.org>> Acesso em: janeiro 2004

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 lymphnode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by *Spolygotyping* and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.809-813, 2001.

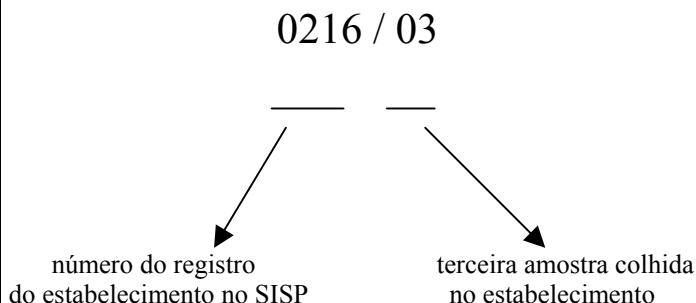
ZUMARRAGA, M., CICUTA, M. E., MARTIN, C., CATALDI, A., ALITO, A., BIGI, F., ROXO, E., SAKAMOTO, S., ROMANO, M. I. Epidemiología molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* del Nordeste Argentino y de Brasil utilizando la técnica de *Spoligotyping*. **Comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional de Nordeste**, 1999a

ZUMARRAGA, M.; MARTÍN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; ERRICO, F.; RAMO, M.C.; CATALDI, A.; VAN SOOLIGEN, D.; ROMANO, M. I. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. **J Journal of Clinical Microbiology.**, v. 37, n. 2, p. 296-303, 1999b

Número do frasco

Composto pelo número do registro do estabelecimento no SISP e número sequencial da amostra, separados por uma barra.

Exemplo:

**Raça predominante**

Marcar uma única opção, aquela que melhor caracterize a propriedade amostrada.

Quando o rebanho for Bovino:

- Zebu: qualquer raça de bovino da espécie *Bos indicus*. Exemplo: considera-se raça zebu predominante quando o rebanho for composto por: (1) bovino de uma única raça (ex: nelore); (2) bovino de duas ou mais raças diferentes (ex: nelore e guzerá); (3) bovinos resultantes de cruzamento entre raças zebuínas, independente do grau de sangue (ex: nelore X guzerá).
- Europeu de leite: raça de origem européia, ou seja, bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção leiteira, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raças desta mesma espécie. Exemplos: holandês e jersey.
- Europeu de corte: raça de origem européia, ou seja, bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção carne, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raças desta mesma espécie. Exemplos: angus, charolês e simental.
- Sem raça definida (SRD): é o bovino resultante de cruzamento entre raças, não permitindo que ele seja incluído dentro de uma ou mais raças específicas, sendo, portanto, considerado como sem raça definida (SRD).
- Outras raças: todas as categorias que não se enquadrarem nas opções acima. São incluídos aqui bovinos resultantes de cruzamentos entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, que dão origem ao gado cruzado (europeus X zebu), independente do grau de sangue. (ex: girolanda, cruzamento industrial).

Procedência do animal: são os dados do GTA

Anexo 2.

Método de descontaminação Petroff

As lesões serão maceradas em um processador mecânico e separadas em três alíquotas, sendo uma parte semeada em meios de Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973) e incubadas a 37° C por até 90 dias; outra processada para a extração do DNA e PCR; e a última, armazenada em -20° C. Nos casos em que houver contaminação, as amostras serão re-processadas para o cultivo, sendo submetidas à descontaminação pelo método de Petroff (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972).

Anexo 3.

Método de descontaminação HPC

HPC (*Hexadecyl pyridinium chloride*) (CORNER; TRAJSTAMAN, 1988), uma alíquota de 1,0 mL contendo o macerado da lesão, foi adicionado 1,0 mL de HPC a 1,5%, posteriormente submetidos a temperatura ambiente durante 30 minutos, logo após foi centrifugado a 2.500 r.p.m. por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ressuspendido o sedimento com 2,0 mL de solução salina estéril e homogeneizado a suspensão 100 µl foram semeados de em meio Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie, em duplicata. Os tubos era incubados em estufa a 37°C, horizontalmente sob um ângulo de aproximadamente 30° e mantidos com as tampas semi-abertas até a completa secagem da superfície do meio. Em seguida eram mantidos em estufa, na posição vertical, examinados diariamente durante a primeira semana para crescimento

de contaminantes, a partir daí eram efetuadas leituras quinzenais até 60 dias de incubação, para amostras negativas o ate o isolamento do agente.

Anexo 4.

Extração de DNA para a PCR

Em virtude do baixo limiar de detecção característico da PCR, foram tomadas precauções necessárias para minimizar o potencial de contaminação dos utensílios e equipamentos de laboratório com material genético, (DIEFFENBACH et al., 1995), diminuindo-se dessa forma o risco de falsos positivos na reação. Controles positivos e negativos foram usados em todas as reações.

Utilizou-se para o isolamento e purificação do DNA das micobactérias o método CTAB (KREMER et al., 1999), com algumas adaptações:

Inicialmente, com o auxílio de alças descartáveis, colônias de micobactérias foram transferidas para tubos de centrífuga de 1500 μ L contendo 400 μ L TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8), sendo incubadas logo em seguida a 80°C por 20 minutos para a inativação dos bacilos (BREMER–MELHIOR P; DRUGEON H B, 1999).

Foi adicionado 50 μ L de 10mg/mL de lisozima com posterior agitação, e incubado-se a 37°C por uma hora ou preferivelmente overnight.

Acrescentou-se 75 μ L de uma solução proteinase K/SDS [5 μ l (10 mg/mL) e 70 μ L SDS(10%)] incubando a 65°C por 10 minutos.

Adicionou-se 100 μ L a 5 M NaCl e 100 μ L de CTAB/NaCl (4,1 g NaCl e 10 g CTAB em 100 mL H₂O), pré-aquecido a 65°C. As amostras foram agitadas até atingirem aspecto leitoso, sendo, em seguida, incubadas 65°C por 10 minutos.

Acrescentou-se 750 μL de clorofórmio: álcool isoamílico agitando-as por 10 segundos e centrifugando a 12000g por 7 minutos.

A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para tubos novos.

O DNA foi precipitado com 450 μL de isopropanol resfriado a -20°C por 30 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos e após desprezar o sobrenadante.

Os sedimentos foram lavados centrifugando-os com 1000 μL de etanol a 70% a 12000 g por 5 minutos

Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento seco foi redissolvido em TE.

Anexo 5.

spoligotyping

Foram realizadas reações de 50 μL contendo tampão de reação, dNTP (2,5 mM cada), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 1,5 mM MgCl₂, iniciador (Dra 5'-GGGTTTGGGTCTGACGAC-3', biotinado em 5'; DRb 5' CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), 1,25 unidades de TAQ polymerase e 1 μL do DNA.

O ciclo de PCR empregado foi: desnaturação a 96°C por 3 minutos, 30 vezes do ciclo de amplificação, 96°C por 1:00 minuto, 55°C por 1:00 minuto e 72°C por 00:30 segundos seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10:00 minutos.

Após a amplificação, 20 μL do produto de PCR era adicionado em 180 μL de 2XSSPE/0,1%SDS (20X SSPE: 0,2M Na₂HPO₄, 3,6 M NaCl; 20 mM EDTA) e feita a desnaturação a 99°C por 15 minutos e colocado em gelo imediatamente para não haver

re-associação das fitas.

A membrana foi sensibilizada lavando-a com 2X SSPE/0,1% SDS a 60° C por 5 minutos e ajustada no miniblotte de maneira a ficar com a linha de aplicação das sondas perpendicular à aplicação das amostras.

Aplicada as amostras, foi feita a hibridização por 60 minutos a 60°C, logo após foi feita a aspiração dos fluídos da miniblotter e lavada a membrana duas vezes com 2XSSPE/0,5% SDS por 10 minutos a 60° C. A membrana foi esfriada em uma bolsa de hibridização, onde foi incubada com o conjugado streptavidina-peroxidase diluída em 2XSSPE/0,5%. Esta etapa era feita a 42° C por 60 minutos.

Lavou-se a membrana duas vezes em 2XSSPE/0,5% SDS por 10 minutos a 42° C seguido de mais duas lavagens em temperatura ambiente com 2X SSPE. Incubou-se a membrana com os reagentes de quimioluminescência (ECL® Amersham Pharmacia). A documentação foi feita em filme radiográfico e a revelação foi feita com reagentes para radiografia, seguindo a indicação do fabricante. Os controles positivos foram DNA cromossomal de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 e *M. bovis* BCG.

Anexo 6.

MIRU-VNTR

Foram realizadas reações de 50 μ L de reação sendo 10 μ L 5x Green Go Taq Reaction Buffer 8,5 pH, 7,5 mM MgCl₂ (Promega), 1,25 mM Pool dNTPs, Taq platinum DNA-polimerase (1,25U), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 1) e 1,0 μ L de DNA da amostra.

O ciclo de PCR empregado foi: desnaturação a 95°C por 3 minutos mais 40 vezes do ciclo a 94°C por 1minuto, 55°C por 1minutos e 72°C por 00:40 segundos, seguidos de um ciclo de extensão final a 72° C por 15min.

Relação dos oligonucleotídeos iniciadores por Supply et al., (2000)

Miru 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC
	GCGCAGCAGAAACGTCAGC
Miru 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC
	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
Miru 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT
	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Miru 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC
	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
Miru 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA
	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
Miru 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
Miru 2	TGGACTTGACGCAATGGACCAACT
	TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
Miru 23	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG
	AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
Miru 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC
	CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
Miru 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG
	GGAGACCGCGACCAGGTA
Miru 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT
	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
Miru 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA
	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA

A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 2% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M

EDTA, pH 8,0). Os géis eram corados em solução de 5 µg/mL de brometo de etídio por 5 a 10 minutos e visualizados em transiluminador ultravioleta. A documentação dos géis foi realizada em câmara digital e o cálculo do tamanho dos produtos de PCR, através do sistema Kodak Digital Science.

Anexo 7.

PCR-PRA

Baseado no método de identificação rápido de micobactérias descrito por TELENTI et al 1993. Foram realizadas reações de 50 µL sendo: 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), dNTP's (2,5 mM cada), 1,5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 200 mM, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador Tb 11 (5'- ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb 12 (5'- CTTGTCGAACCGCATAACCCT), que amplificam um fragmento de 439 bp, responsável pela codificação da proteína de choque térmico (*hsp 65*), que caracteriza o isolado como pertencente ao gênero *Mycobacterium*. 1,25 unidades de *TAQ polymerase* e 5µL de DNA da amostra. O ciclo de PCR empregado foi: 45 vezes do ciclo de amplificação, 94°C por 1:00 minuto, 60°C por 1:00 minuto e 72°C por 1 minuto seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10:00 minutos.

O produto de PCR de 439 bp é então submetido à digestão pelas enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*

BstEII.

Foram realizadas reações de 20 μL com 0,5 μL da enzima *BstEII* (=5U), 0,2 μL de BSA (soro albumina bovina), 2 μL D 10x Buffer, 7,3 μL H₂O ultra pura e 10 μL do produto de PCR a 60°C por 60 minutos.

HaeIII.

Foram realizadas reações de 20 μL com 0,5 μL da enzima *HaeIII* (=5U), 2 μL REact 2, 7,5 μL H₂O ultra pura e 10 μL do produto de PCR a 37°C por 60 minutos.

As eletroforese foram feitas em cubas horizontais, usando-se tampão de corrida TBE (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA, pH 8,0) e agarose nobre a 3,0% (p/v). Os géis de agarose foram corados em solução de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo por 5 a 10 minutos e visualizados em transiluminador ultravioleta.

As documentações foram feitas em filme para fotografia instantânea.

Anexo 8.

Questionário Epidemiológico

01-Código do rebanho no estudo: _____ Data da visita: __/__/____

02- Identificação

Município: _____ UF: _____ EDA: _____
 Proprietário: _____ tel: (____) _____
 Propriedade: _____
 Endereço propriedade: _____

02 A- Identificação

Município: _____ UF: _____ EDA: _____
 Proprietário: _____ tel: (____) _____
 Propriedade: _____ Ender
 eço propriedade: _____

03-Coordenadas: Latitude $\square\square^\circ\square\square'$ $\square\square,\square''$ Longitude $\square\square^\circ\square\square'$ $\square\square,\square''$ Altitude:(m): _____04- Tipo da exploração: corte leite mista05- Tipo de Criação: confinado semi-confinado extensivo06- N° de Ordenhas por dia: 1 ordenha 2 ou 3 ordenhas não ordenha07- Tipo de ordenhas: manual mecânica ao pé mecânica em sala de ordenha não ordenha

08- Produção de leite: a) Número de vacas em lactação: _____
 b) Produção diária média de leite na fazenda : _____ Litros

09- Usa inseminação artificial?

 não usa inseminação artificial e touro usa só inseminação artificial

10- Raça predominante :

Bovino: zebu europeu de leite europeu de corte mestiço outras raças:Bubalinos: murrha mediterrâneo carabao Jafarabadi outras raças

11(a)- Número de bovinos da propriedade

Machos castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)			
	0-6	6-12	12-24	>24	0-6	6-12	12-24	>24
Total								

11(b)- Número de bubalinos da propriedade

Machos castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)			
	0-6	6-12	12-24	>24	0-6	6-12	12-24	>24
Total								

12- Outras espécies na propriedade: ovinos/caprinos eqüídeos suínos aves cão gato

13- Espécies silvestres em vida livre na propriedade:

não tem cervídeos capivara outras:.....

14- Faz testes rotineiros de diagnóstico nos animais? não sim,
qual(is)?.....

Regularidade dos testes: Uma vez ao ano duas vezes ao ano quando compra animais

15- Compra animais para serem introduzidos na propriedade? não sim

Onde/de quem: em exposição em leilão/feira de comerciante de gado diretamente de outras fazendas

de quem compra habitualmente:

nome do proprietário nome da propriedade município endereço

.....

.....

.....

.....

.....

16- Vende animais para serem introduzidos em outra(s) propriedade(s)?

não, apenas para abate sim

Onde/para quem: em exposição em leilão/feira comerciante de gado diretamente p/ outras fazendas

para quem vende habitualmente:

nome do proprietário nome da propriedade município endereço

.....

.....

.....

.....

.....

17- local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva:

na própria fazenda em estabelecimento sem inspeção veterinária

em estabelecimento de abate com inspeção veterinária não abate

18- Aluga pastos em alguma época do ano: não sim**19- Tem pastos em comum com outras propriedades?** não sim**20- Existe na propriedade área alagadiças as quais o gado tem acesso?** não sim**21- A quem entrega o leite?** cooperativa laticínios direto ao consumidor não entrega**22- Resfriamento do leite:** não faz faz,

como: em refrigerador/tanque expansão próprio refrigerador/tanque expansão coletivo

23- Como é feita a coleta do leite ? latões caminhão tanque**24- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade:** não sim,

com que finalidade: p/ consumo próprio p/ venda

25- Consome leite cru? não sim**26- Tem assistência veterinária?** não sim,

de que tipo? veterinário da cooperativa veterinário particular

Nome do veterinário: _____ Assinatura: _____

Anexo 9.Resultado do *spoligotyping* para as 248 amostras analisadas

Numero da amostra no LZB*	Espoligotipo	Padrão de espoligotipo.
01/02	Sb0134	1100011101111110111111111111111111111100000
02/02	Sb0121	1101111101111110111101111111111111111100000
03/02	Sb0295	110111110111111011110111111111111111110100000
04/02	Br7	0000000000011110111111111111111111111100000
07/02	Sb0140	11011010000011101111111111111111111111100000
08/02	Br8	110111110111111011111110000000000111100000
09/02	Sb0134	11000111011111101111111111111111111111100000
10/02	Br11	1101111101111110111101111110111111111110100000
12/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
13/02	Ar28	11011111011110000011011111111111111111100000
14/02	Br12	01011111011111101111011110111111111111100000
15/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
16/02	Br10	1101111001111110111101111111111111111110100000
17/02	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
18/02	Sb0120	11011111011111101111111111111111111111100000
19/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
20/02	Ar28	110111110111100000110111111111111111111100000
21/02	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
22/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
25/02	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
26/02	Br6	11011110011111101111011110001111111110100000
29/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
30/02	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
31/02	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
32/02	Br11	1101111101111110111101111110111111111110100000
33/02	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
01/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
02/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
03/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
04/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
05/03	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
06/03	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
09/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
10/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
12/03	Sb0120	11011111011111101111111111111111111111100000
13/03	Sb0120	11011111011111101111111111111111111111100000
14/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
16/03	Sb0295	1101111101111110111101111111111111111110100000
18/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
19/03	Br6	11011110011111101111011110001111111110100000
20/03	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
22/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
25/03	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
26/03	Br6	11011110011111101111011110001111111110100000
29/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
30/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
31/03	Sb0140	110110100000111011111111111111111111111100000
32/03	Sb0120	11011111011111101111111111111111111111100000
33/03	Sb0120	11011111011111101111111111111111111111100000
34/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000
35/03	Br7	000000000001111011111111111111111111111100000
36/03	Sb0121	11011111011111101111011111111111111111100000

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)