

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM ANIMAIS SILVESTRES EM
SUB-REGIÕES DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE

Letícia Alves Gomes Albertti

CAMPO GRANDE, MS

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM ANIMAIS SILVESTRES EM
SUB-REGIÕES DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

*Mycobacteria detection from wildlife animals in Pantanal sub-regions of Mato
Grosso do Sul*

Letícia Alves Gomes Albertti

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal
Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS

2014

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer a Deus, pela oportunidade de conhecer pessoas tão incríveis que fizeram deste trabalho não só um aprendizado didático, mas uma lição de vida.

Meu bebê, que se não fosse por ela, dificilmente isso teria se concluído.

Mamãe, que está sempre presente, acreditando em todas as minhas mirabolantes ideias nunca duvidando do meu potencial mesmo quando nem eu acredito.

Ivan, que me socorreu em todos os percalços, desde um pneu furado até longas tardes com a Maria Clara enquanto eu terminava a tese.

Irmã, que completa minha vida com seus sábios e pacienciosos conselhos.

Felipe e Carla, que me ajudaram em situações de pouquíssima sanidade e resistiram bravamente.

À tia, madrinha, professora Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório pela orientação e paciência.

Ao meu coorientador Antonio Francisco Souza Filho a quem eu devo todos os meus conhecimentos em ciência animal, parceiro de viagens acadêmico-turísticas, psicólogo, consultor de projeto, tese e assuntos diversos. Muito obrigada mesmo!!

À Professora Dra. Klaudia dos Santos G. Jorge pelas considerações e companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao colega Igor Alexandre H. F. S. Péres que além da ajuda nas coletas sempre foi muito solícito e prestativo com todas as minhas dúvidas.

À professora Dra. Aiesca O. Pellegrin e a sua equipe na Embrapa Pantanal pela cooperação no desenvolvimento desse trabalho.

A Antônio Augusto Fonseca Júnior e equipe do laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO-MG por toda atenção e ajuda nos experimentos.

A minha amiga, chefe e consultora professora Dra. Aline P. Lorenz Lemke que além de entender todas as minhas ausências do último semestre, apoiou a conclusão desse trabalho sempre pronta pra ouvir minhas problemáticas, dúvidas e reclamações.

A todos os colegas do LEBio, Alyne, Ana Letícia, Laís, Priscila, Ricardo, Roberto, Thiago, Weg que compreenderam as minhas faltas e falhas nos últimos meses, e mesmo assim sempre me esperam pro café.

A equipe do Laboratório de Micobacteriologia da FAMEZ/UFMS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS e seus docentes.

Às agências de fomento CAPES e Fundect.

Meu muito obrigado!!!

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning”*

Albert Einstein

RESUMO

ALBERTTI, L.A.G. Detecção de micobactérias em animais silvestres em sub-regiões do Pantanal sul-mato-grossense. 2014. 56 f. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014

Alguns patógenos, como as micobactérias, são transmitidos entre meio ambiente, animais silvestres, animais domésticos e o homem podendo resultar em prejuízos econômicos na pecuária e problemas de saúde pública. No Pantanal sul-mato-grossense a constante simpatria entre eles veados campeiro, porcos monteiro, aves e o rebanho bovino, gera preocupação sobre o possível envolvimento de animais silvestres no ciclo de vida de *Mycobacterium bovis*, que pode repercutir no controle e erradicação da tuberculose bovina. Por isso, o interesse em avaliar a situação epidemiológica desse patógeno em espécies de animais silvestres. Isolados de BAAR (Bacilos Álcool-Ácidos Resistentes) obtidos de dezesseis porcos monteiro (*Sus scrofa*), oito veados campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) e de um quati (*Nasua nasua*) foram sequenciados para a região *hsp65* (*heat shock protein 65*) e analisados pela técnica MIRU-VNTR para determinação das espécies de micobactérias isoladas. As análises mostraram a presença de sete espécies de micobactérias distintas: *M. avium*, *M. nonchromogenicum*, *M. asiaticum*, *M. saskatchewanense*, *M. parascrofulaceum*, *M. paraffinicum* e *M. bovis*. O presente estudo pode contribuir para análise do possível risco de animais silvestres como agentes disseminadores de micobactérias no Pantanal sul-mato-grossense, especialmente a espécie *M. bovis*, aprimorando as estratégias de controle e erradicação da tuberculose bovina.

Palavras-chave: tuberculose bovina, animais silvestres, Pantanal sul-mato-grossense

ABSTRACT

ALBERTTI, L.A.G. Mycobacteria detection from wildlife animals in Pantanal sub-regions of Mato Grosso do Sul. 2014. 56 f. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014

Some pathogens as mycobacterias are transmitted among environment, wildlife, livestock and human beings which may result in economic losses in herds and public health problems. In the Pantanal of Mato Grosso do Sul the sympatric relationship among pampa deer, feral pig, birds and livestock raises concerns about the possible involvement of wild animals in the *Mycobacterium bovis* life cycle which could hamper the control and eradication of this disease. Thus, we evaluated the epidemiologic status of this pathogen in wildlife animals. Sixteen AFB (Acid-Fast Bacillus) isolates from feral pigs (*Sus scrofa*), eight from pampa deers (*Ozotocerus bezoarticus*) and one from coati (*Nasua nasua*) were sequenced for the region *hsp65* (heat shock protein 65) and analyzed by MIRU-VNTR in order to determine the mycobacteria species isolated. The analysis identified seven mycobacteria: *M. avium*, *M. nonchromogenicum*, *M. asiaticum*, *M. saskatchewanense*, *M. parascrofulaceum*, *M. paraffinicum* and *M. bovis*. The present study may contribute to analyze the risk of wild animals as potential disseminators of mycobacteria in the Pantanal sul-mato-grossense, especially *M. bovis* specie improving control and eradication strategies for bovine tuberculosis.

Keywords: bovine tuberculosis, wildlife, Pantanal sul-mato-grossense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Pantanal sul-mato-grossense.....	10
1.2 Filogenia de <i>Mycobacterium</i>	12
1.3 A tuberculose em animais silvestres, domésticos e asselvajados.....	15
1.4 Epidemiologia Molecular.....	17
1.4.1 MIRU-VNTR.....	20
1.4.2 Sequenciamento.....	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
ARTIGO.....	25
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE A.....	45
APÊNDICE B.....	48
APÊNDICE C.....	49
APÊNDICE D.....	50
APÊNDICE E.....	51
APÊNDICE F.....	52

1 INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* e faz parte de um grupo de organismos conhecido como complexo *M. tuberculosis*, do inglês *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), que inclui nove espécies estreitamente relacionadas, os patógenos humanos *M. tuberculosis* e *M. africanum* e um grupo de micobactérias patogênicas para animais, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. pinnipedi* e *M. orygis* (2014; Galagan, 2014; Rodriguez-Campos et al., 2014).

Mycobacterium bovis são cocobacilos medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento. São microaerófilos, não flagelados, não esporulados, não capsulados nem formadores de toxina. Como as demais micobactérias, o diagnóstico por bacterioscopia direta é feito por meio da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), a qual utiliza a característica destas bactérias de possuírem paredes celulares com alto teor de lipídeos (cerca de 60%, principalmente de ácido micólico), que quando tratadas pelo corante fucsina fenicada coram-se de vermelho e persistem ao descoramento subsequente por uma solução de álcool-ácido forte (diferenciador). É por isso que são conhecidas por bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Corner, 1994).

A tuberculose bovina é uma doença crônica causada principalmente por *M. bovis*, e mais raramente por *M. caprae*, ambas pertencentes ao MTBC (Schöning et al., 2013). Além dos bovinos, *M. bovis* pode acometer outros animais domésticos, animais silvestres e humanos resultando em prejuízos econômicos e risco para a saúde pública (OIE, 2012; Palmer et al., 2012; Thoen et al., 2009). Outras espécies também potencialmente patogênicas para o rebanho e seres humanos são *M. avium* e *M. intracellulare*, membros do complexo *M. avium* (MAC) (Biet et al., 2005; El-Sayed et al., 2013).

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, mas a sua prevalência é maior em países em desenvolvimento onde o conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitados (Ereqat et al., 2013; Reddington et al., 2011). No Brasil, os dados de notificações oficiais

de tuberculose bovina indicaram prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 (Brasil, 2006a, b).

A doença em bovinos representa um risco à população humana e é responsável por altas perdas econômicas na pecuária, mesmo em países desenvolvidos (Parra et al., 2003). A principal forma de controle e erradicação da tuberculose é baseada num sistema de diagnóstico e abate de animais infectados (Alvarez et al., 2012). No entanto, esta prática é prejudicada pela presença de outros animais hospedeiros de *M. bovis*, como os animais silvestres, que normalmente não são incluídos nos programas de vigilância e controle, mas podem funcionar como reservatórios de infecção e, portanto como fontes potenciais do agente da tuberculose para rebanhos domésticos e seres humanos (Mayer et al., 2012)

No Pantanal sul-mato-é comum a ocorrência de veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e de porco monteiro (*Sus scrofa*). A crescente densidade populacional de porcos monteiro gera preocupação com relação ao controle de doenças compartilhadas por esses animais e o rebanho bovino, devido ao hábito fuçador, dieta onívora, habilidade em ultrapassar barreiras, contato com animais silvestres e domésticos e suscetibilidade a infecções micobacterianas (Boadella et al., 2011; Nugent et al., 2002).

Apesar da falta de dados epidemiológicos de tuberculose bovina na região do Pantanal, a relação simpátrica dos rebanhos bovinos com os animais silvestres é de extrema importância para a compreensão da disseminação e manutenção de *M. bovis* entre essas espécies.

1.1 Pantanal sul-mato-grossense

O Pantanal é um vasta planície alagada localizada na porção central da América do Sul, ocupando uma área de 140.000 km² na parte superior da bacia do Rio Paraguai. A maior parte de sua extensão está dentro do Brasil, com áreas menores no sul do Paraguai e norte da Bolívia. Dentre as principais características desta região estão a baixa altitude, a alternância de períodos de enchente e seca, e a variação das precipitações plurianuais (Hamilton et al., 1996).

A cada ano, grandes regiões do bioma mudam de habitats aquáticos para terrestres e vice-versa. O complexo de nutrientes, biota e níveis de inundação forma um sistema dinâmico e desempenha um papel importante na diversidade biológica, por causa da diversidade de oferta de habitats naturais, oportunidades para alimentação e nichos reprodutivos (Alho, 2008; Hamilton et al., 1996)

A relação entre inclinação do solo, inundação e topografia influenciam muito a vegetação, que ocorre como um mosaico de habitats abertos, aquáticos e florestais. A composição da flora e fauna do Pantanal é influenciada pelos biomas ao seu redor: Cerrado, Amazônia, Chaco e Mata Atlântica. Apresenta vários tipos de vegetação arbórea, campestre e aquática. As principais fitofisionomias são savana florestada, savana arborizada, savana gramíneo-lenhosa, vegetação de área úmida – áreas onde o solo se encontra encharcado, mas sem formar lâmina d'água, área alagada – onde o solo se encontra totalmente coberto pela lâmina d'água e os corpos d'água – regionalmente conhecidos como baías ou salinas, que podem ou não apresentar predominantemente macrófitas aquáticas e/ou algas (Alho, 2008; Tubelis and Tomás, 2003).

A área mais utilizada para pastejo de bovinos e animais silvestres são os corpos d'água temporários, com predominância da vegetação savana gramíneo-lenhosa. A complexa cobertura vegetal e a produtividade sazonal dão suporte ecológico para uma fauna diversa e abundante do Pantanal: 263 espécies de peixes, 41 de anfíbios, 113 de répteis, 463 de aves e 132 de mamíferos (Alho, 2008; Soriano et al., 1997).

No Pantanal, os veados campeiro e porcos monteiro estão em constante simpatria com outros animais silvestres, aves e mamíferos, além de animais domésticos, compartilhando bebedouros e pastagem. O envolvimento de animais silvestres no ciclo de vida de *M. bovis* e na transmissão para o gado repercute no controle da tuberculose bovina, comprometendo o processo de erradicação. Os hospedeiros reservatórios de *Mycobacterium* têm em comum, alta densidade populacional, uma interação interespecífica contínua na interface animal doméstico-selvagem, o que favorece a persistência da doença

(Palmer et al., 2004). No Pantanal, os veados campeiro normalmente são encontrados em grupos de 2 a 18 indivíduos e sua densidade populacional varia de 2,5 a 9,8 indivíduos/km², enquanto que a densidade dos bovinos é um pouco maior, variando em torno de 16 indivíduos/km² (Rodrigues, 1996; Tomás et al., 2001). Os porcos monteiro estão em grande densidade populacional no Pantanal, entre 1,58 a 11 indivíduos/km², enquanto os quatis (*Nasua nasua*), tem uma densidade populacional estimada em 9 a 16,6 indivíduos/km² (Desbiez and Borges, 2010).

1.2 Filogenia de *Mycobacterium*

As espécies do gênero *Mycobacterium* possuem notável facilidade para invadir e estabelecer-se em vários hospedeiros mamíferos, além de serem estreitamente relacionados como mostram as análises filogenéticas (Smith et al., 2006).

(Wirth et al., 2008) propuseram que o MTBC é composto de duas linhagens principais, sendo a linhagem 1 composta exclusivamente de isolados *M. tuberculosis stricto sensu*, exceto o grupo do Leste Africano-Indiano (EAI) e a linhagem 2 composta principalmente de isolados de animais (*M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinipedii*) e isolados do Leste Africano (*M. africanum* West African 1 e 2). Essas duas linhagens são clones do progenitor *M. prototuberculosis* que surgiu aproximadamente 40.000 anos atrás (Smith et al., 2006).

Estudos de genômica comparativa entre uma estirpe de *M. tuberculosis* e outra de *M. bovis* identificaram mais de 140 genes cuja presença é facultativa e que estão relacionados com diferenças ao nível do fenótipo, hospedeiro preferencial e virulência. Muitos desses genes ocorrem em regiões de diferenciação (RD), regiões cromossômicas que foram eliminadas em determinadas espécies. O genoma de *M. bovis* tem 66.040 pares de bases (pb) a menos que *M. tuberculosis*, com similaridade de 99,9% e elevado teor de sequências GC (~ 65%) mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões. Apesar da similaridade genética com *M. tuberculosis*, o genoma de *M. bovis* tem sido reduzido devido

a deleções, eventos considerados unidirecionais nessas bactérias. Assim, as deleções de DNA em *M. bovis* são os principais responsáveis pela diferenciação (Mostowy and Behr, 2005; Smith et al., 2006).

Além das espécies de micobactérias do MTBC, as mais estudadas são aquelas do MAC (*M. avium* e *M. intracellulare*) e *M. kansasii* (Biet et al., 2005). A espécie *M. avium* é subdividida em quatro subespécies *M. avium* subsp. *avium* (Maa); *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. avium* subsp. *hominissuis* (El-Sayed et al., 2013; Rindi and Garzelli, 2014).

Os membros do MAC são um grupo heterogêneo de micobactérias de crescimento lento. Recentemente, com base em testes fenotípicos e moleculares, confirmou-se a estreita relação dos diferentes organismos pertencentes ao MAC, que revelou a existência de uma ampla variedade de organismos ambientais associados a animais com diferentes graus de patogenicidade, tropismo ao hospedeiro e distribuição ambiental, de modo que oito espécies de micobactérias de crescimento lento (*M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. chimaera*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. boucherdurhonense*, *M. vulneris*; e um subconjunto adicional de isolados de classificação indeterminada chamado "MAC-outros") estão incluídos no complexo (Rindi and Garzelli, 2014).

Dentro do MAC, *M. avium* é a espécie clinicamente mais significativa para os seres humanos e animais além de ser a micobactéria ambiental mais encontrada, em virtude da sua presença em várias fontes de propagação como água, solo, parasitas, inseto e roedores (El-Sayed et al., 2013; Muwonge et al., 2014). É o agente da tuberculose em várias espécies de aves além de estar associado aos quadros de linfadenite granulomatosas em suínos. Nos bovinos, a subespécie Map causa a doença de Johne (Biet et al., 2005) e também tem sido isolada de tecido de humanos com doença de Crohn (Abubakar et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Schwartz et al., 2000).

Outras espécies de micobactérias consideradas atípicas, diferentes das espécies pertencentes ao MTBC e MAC, são chamadas de micobactérias não

tuberculosas (NTM), do inglês *Nontuberculous Mycobacteria*, classificadas de modo geral como ambientais (Tortoli, 2012). Isso porque as NTM estão amplamente distribuídas no ambiente natural, dentre solo, água potável e água parada (Castillo-Rodal et al., 2012), insetos (Fischer et al., 2001; Fischer et al., 2003) e protozoários (Kirschner et al., 1992; Whittington et al., 2001). Apesar de serem descritas como não tuberculosas, essas micobactérias são importantes patógenos em indivíduos imunossuprimidos, pacientes com doenças degenerativas crônicas e congênitas (Escobar-Escamilla et al., 2014). Doenças progressivas de pulmão, linfadenites e infecções com localizações extrapulmonares como pele e tecidos moles, são algumas das formas clinicamente reconhecidas (Gopinath and Singh, 2010). As doenças causadas por NTM são consideradas emergentes pela dificuldade em controlar as fontes de infecção e pela resistência aos fármacos convencionais utilizados contra a tuberculose, pirazimida, rifampicina e isoniazida (Gómez, 2009).

As espécies de NTM estão distribuídas dentre de seis grupos os complexos de ambos os complexos (*M. simiae*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. smegmatis*), assim como o MAC, ampla distribuição geográfica e ambiental (Tortoli, 2012, 2014). As espécies de *Mycobacterium* além de causarem importantes doenças em seres humanos podem infectar amplo número de espécies animais, especialmente *M. bovis*, que já demonstrou ter uma variedade de hospedeiros que inclui o homem, animais domésticos e silvestres (Cousins and Florisson, 2005; Escobar-Escamilla et al., 2014).

(Zamarioli et al., 2008) descreveram micobactérias oportunistas, dentre elas, espécies do MAC, *M. nonchromogenicum* e *M. terrae* em pacientes HIV positivos e negativos. A espécie *M. paraffinicum* foi pela primeira vez identificada em um caso humano de infecção pulmonar sintomática (Chan et al., 2014).

O diagnóstico alérgico-cutâneo com tuberculina, instrumento básico para programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo, pode revelar reações falso positivas, que são as infecções por micobactérias ambientais. A estratégia do teste comparativo, valendo-se de tuberculina

bovina e aviária, esclarece a infecção mista daquela falsa positiva (Brasil, 2006b).

1.3 A tuberculose em animais silvestres, domésticos e asselvajados

As doenças infecciosas emergentes (DIE) de animais silvestres de vida livre podem ser classificadas em três grupos principais, com base nos critérios da chave epizootológica: (i) DIE dispersadas de animais domésticos para populações de animais silvestres que vivem na proximidade; (ii) DIE relacionadas diretamente à intervenção humana, por meio de translocações do parasita ou hospedeiro; e (iii) DIE, sem envolvimento evidente de humano ou animal doméstico (Daszak et al., 2000).

Mycobacterium bovis, o agente da tuberculose bovina, apesar da pouca representatividade de casos em humanos, pode sim acometer indivíduos imunossuprimidos, além de trabalhadores que mantém contato direto com animais infectados, caracterizando-se como um problema de saúde pública (Corner, 2006; Corner and Gormley, 2012; Palmer et al., 2012).

Mycobacterium bovis apesar de apresentar tropismo pelos bovinos, pode infectar um amplo número de espécies, mais de 40 espécies de mamíferos já foram demonstradas susceptíveis a infecção por esse patógeno (Nugent, 2011). Os países desenvolvidos e em desenvolvimento batalham arduamente para o controle e erradicação da tuberculose bovina, no entanto os animais silvestres têm sido considerados importantes reservatórios de *M. bovis* e possíveis mantenedores do patógeno no meio ambiente (Biek et al., 2012; Cunha et al., 2012)

As interações entre animais silvestres, animais domésticos e o homem, com relação à ecologia do hospedeiro, patógeno e meio ambiente, são ainda incompreendidas e complexas. Fatores antropogênicos, como translocação e introdução de animais silvestres em um novo habitat, invasão do ambiente silvestre pelo homem, transmissão de doenças bovinas para animais silvestres, são facilitadores tanto para infecções “*spillback*” quanto “*spillover*” (Palmer et al., 2012).

O entendimento dos hospedeiros *spillover* e de manutenção é fundamental para o controle da tuberculose. O termo *spillover* é usado para descrever a transmissão de hospedeiros mantenedores para não mantenedores. Entre hospedeiros *spillover*, a doença não persiste sem uma fonte de reinfecção externa. Esta fonte de infecção externa é muitas vezes uma população isolada de hospedeiros suscetíveis, selvagens ou domésticos. Por definição, a doença em hospedeiros *spillover* desaparecerá assim que a doença for eliminada da fonte de infecção. Hospedeiros *spillover* podem ser hospedeiros finais e não desempenhar qualquer papel na transmissão da doença, mas a doença pode persistir por um tempo limitado. Ao contrário, entre hospedeiros de manutenção, a doença persiste sem uma fonte externa de reinfecção (Palmer et al., 2012).

A transmissão a partir de um hospedeiro *spillback* ocorre no sentido inverso, de hospedeiros não mantenedores para mantenedores. No entanto, o conceito de manutenção e transmissão do tipo *spillover* ou *spillback* pode variar dependendo dos parâmetros epidemiológicos. Isso explica alguns casos onde hospedeiros de manutenção podem em situações de alta densidade populacional, tornarem-se hospedeiros *spillover* (Nugent, 2011). Hospedeiros *spillover* podem ocasionalmente apresentar um papel epidemiológico crucial através da transmissão da infecção de volta para o hospedeiro mantenedor (*spillback*). Na maioria dos casos, *M. bovis* era originalmente introduzido por *spillover* a partir do gado doméstico (hospedeiro de manutenção) para população selvagem suscetível (hospedeiros de manutenção ou *spillover*). Não há uma demarcação nítida entre hospedeiros *spillover* e de manutenção, mas sim uma persistência contínua e eficiência de transmissão entre os membros das populações hospedeiras (Nugent, 2011; Nugent et al., 2002; Palmer et al., 2012).

Três fatores-chave fazem a transmissão *spillback* muito mais importante epidemiologicamente do que a sua baixa frequência de ocorrência pode sugerir: amplificação do reservatório de *M. bovis*, propagação espacial muito maior do que pelo hospedeiro de manutenção e maior persistência da *M. bovis* em hospedeiros *spillover* de vida longa, aumentando o risco de *spillback* no futuro. O risco de *spillback* é baixo, mas determina a natureza, a escala e a

duração da gestão da erradicação da doença. Essa gestão deve ser focada na infecção em hospedeiros de manutenção e redução ou eliminação de qualquer risco de *spillback* (Nugent, 2011; Nugent et al., 2002; Palmer et al., 2012).

Acredita-se que a principal via de transmissão entre animais ocorre principalmente pela inalação de aerossóis contaminados durante contatos sociais, principalmente durante o compartilhamento de bebedouros e pastagem. Contudo, a sobrevivência de *M. bovis* por períodos prolongados no solo, pode também constituir um risco. Tais riscos podem ser resultantes da influência humana; por meio do cerceamento, fornecimento de alimentação complementar, abandono de vísceras de animais abatidos ou mortos nos campos, além do manejo da vida silvestre (Corner et al., 2012; Gortazar et al., 2011; Schöning et al., 2013).

1.4 Epidemiologia Molecular

Os primeiros estudos filogenéticos de micobactérias foram realizados com base em similaridades fenotípicas (Tortoli, 2012), análise de características bioquímicas e perfil de crescimento em cultura. Mas por ser um experimento demorado e de fraca reprodutibilidade, não apresenta grande poder discriminatório.

Para identificação e caracterização das mais de 150 espécies do gênero *Mycobacterium* já foram padronizadas diferentes técnicas, algumas com interesse maior na pesquisa, como cromatografia de camada fina e cromatografia de gás líquido, que analisa a composição lipídica da parede celular das micobactérias (Butler and Guthertz, 2001); e outros com maior aplicabilidade em laboratórios de diagnóstico como a cromatografia de alta performance (HPLC) do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, que avalia ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. Com o surgimento de muitas espécies que compartilhavam do mesmo padrão nas análises de HPLC, seu uso foi diminuído e substituído pelo espectrômetro de massa MALDI-TOF (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*), uma ferramenta rápida que identifica as principais bactérias (El Khéchine et al.,

2011). No entanto, também apresenta algumas limitações, dentre elas a falta de um banco de dados completo.

Um salto qualitativo ocorreu a partir da década de 60, com o progresso do conhecimento genético e mais recentemente com a criação de bancos de dados de domínio público que armazenam em tempo real, sequências genéticas em toda parte do globo (Tortoli, 2012). Na década de 1980, sob a influência dos avanços na biologia molecular, os métodos de tipagem baseados no DNA foram desenvolvidos com melhor poder discriminatório em relação aos métodos fenotípicos.

A taxonomia genotípica procura analisar regiões altamente conservadas, porém abriga sequências hipervariáveis, dentro do genoma, essas regiões apresentam exclusões, inserções ou deleções de nucleotídeos específicos dentro de determinada espécie. As técnicas de genotipagem usadas para identificação de espécies de micobactérias são baseadas em sequenciamento de genes conservados. Um grande número de genes constitutivos (*housekeeping genes*) se mostraram adequados para essa finalidade (Tortoli, 2003, 2012, 2014).

O padrão ouro utilizado para identificação de vários procaríotos durante muito tempo tem sido a região do *16S rRNA*, por ser um gene altamente conservado existente em todos os seres vivos, e as variações nucleotídicas estarem concentradas em áreas específicas. A investigação genética baseada em *16S rRNA* da taxonomia e filogenia de micobactérias se concentra em duas sequências hipervariáveis conhecidas, região A e B. Para fins de identificação, a sequência da região A é geralmente suficiente, enquanto que a região B pode ser considerada confirmatória uma vez que a sua sequência é compartilhada por um grande número de espécies (Tortoli, 2003).

A premissa de que as cepas bacterianas pertencem a mesma espécie se tiverem até 15 bases de diferença nas suas sequências do gene *16S rRNA* não é aplicável para micobactérias cujos membros são estreitamente relacionados. Considerando que a identidade das sequências de micobactérias pode ter

similaridade $\geq 99\%$, outros marcadores começaram a ser estudados (Adékambi and Drancourt, 2004; Kim et al., 2014; Tortoli, 2003).

Outras maneiras de analisar a tipagem molecular de membros do MTBC são por meio das técnicas do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP), o *spoligotyping* e MIRU-VNTR (Collins, 2011; El-Sayed et al., 2013; Smith et al., 2006). O método de RFLP possui excelente poder discriminatório quando se investiga a espécie *M. tuberculosis*, pois o número de cópias da sequência de inserção IS6110 é geralmente bastante elevado, maior que vinte e cinco cópias (Devallois et al., 1998). Porém, quando testada em isolados de *M. bovis* apresenta uma capacidade pequena de discriminação, já que a maioria deles possui no máximo oito cópias desse fragmento (Aranaz et al., 1996; Collins, 2011; Cousins and Dawson, 1999; Haddad et al., 2004; Kremer et al., 1999)

O gene da proteína de choque térmico 65-kDa (*hsp 65*) é codificador de uma proteína constitutiva altamente conservada entre as espécies de micobactérias. No entanto, apresenta regiões hipervariáveis cujas sequências podem ser utilizadas com o fim de identificação. Essa proteína está envolvida no dobramento, montagem e transporte de outras proteínas (Telenti et al., 1993; Tortoli, 2003). Uma das técnicas mais descritas para a identificação de micobactérias é o PCR-PRA do inglês (*PCR Restriction-enzyme Analysis*), que consiste num PCR-RFLP, onde o gene da proteína *hsp65* é amplificado e digerido com duas enzimas de restrição (*BstEII* e *HaeIII*) (Ringuet et al., 1999). Esses padrões para caracterização de diversas espécies de micobactérias podem ser conferidos em uma ampla base de dados PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Um alvo que vem despertando o interesse dos taxonomistas é a região entre os genes codificadores dentro da região 16S e 23S *rRNA*, que é conhecido como *Internal Transcribed Space* (ITS), além de outras regiões como o gene *sodA* codificador da superóxido dismutase, o gene *rpoB*, codificador da subunidade β da RNA polimerase e do gene *recA* parte codificante do sistema de reparo e recombinação do DNA. Todos esses marcadores além de serem analisados por meio de visualização de diferentes

padrões em gel de agarose, podem também serem avaliados por meio de sequenciamento dessas regiões amplificadas por PCR (Adékambi and Drancourt, 2004; Tortoli, 2012, 2014).

Spoligotyping constitui importante banco de dados disponível no SpolDB4 lançado em 2006; baseia-se na amplificação por PCR do DNA no *locus* denominado de região de repetição direta (*direct repeat* - DR), exclusivo do genoma de micobactérias do MTBC, para detectar a presença ou ausência de espaçadores nesse *locus*. A detecção é feita pela hibridação dos espaçadores a uma membrana, usando um *miniblotter* (Kamerbeek et al., 1997). No entanto, este método possui poder discriminatório baixo quando usado sozinho e deve ser utilizado de preferência em conjunto com um segundo método de tipagem, como o MIRU-VNTR, para estudos epidemiológicos de alta resolução (Demay et al., 2012).

1.4.1 MIRU-VNTR

Após a conclusão do genoma da estirpe H37Rv da espécie *M. tuberculosis*, alguns dos isolados clínicos foram completamente sequenciados, o que levou a comparação *in silico* do genoma e identificou vários marcadores genômicos que podem esclarecer tanto a epidemiologia como a análise evolutiva da população de *M. tuberculosis*. Entre esses marcadores, o método de tipagem discriminatório denominado unidades repetitivas micobacterianas (do inglês *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* - MIRU) baseado no estudo de *loci* contendo números variáveis de repetições em sequência (do inglês *Variable Number Tandem Repeats* - VNTR) foi proposto como um método promissor que pode discriminar espécies do MTBC e, em muitos casos, estimar a transmissão e a identificação de linhagens genéticas (McLernon et al., 2010; Supply et al., 2006).

O polimorfismo nos *loci* pode decorrer tanto da mudança na sequência dos nucleotídeos como da variação no número de unidades repetidas. A tipagem MIRU-VNTR visa *loci* genéticos que estão distribuídos por todo o genoma; esses *loci* contém uma variação na quantidade de sequências repetidas, gerando polimorfismo genético (van Belkum et al., 1998). A partir de uma tabela de alelos que relaciona o peso molecular obtido com o número de

alelos repetidos em cada locus, obtém-se um código numérico, que corresponde ao número de repetições do locus alvo e serve como uma impressão digital do respectivo isolado (Kremer et al., 2005; Rodriguez-Campos et al., 2014; Supply et al., 1997).

Uma vez determinado o perfil de alelos para cada cepa, os dados podem ser analisados empregando um aplicativo web MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>). Esse serviço permite aos usuários acesso livre para comparar perfis alélicos de isolados de micobactérias de diferentes regiões do mundo depositados no banco de dados que representa as principais linhagens do MTBC (Allix-Beguec et al., 2008; Weniger et al., 2010).

Mais recentemente foi descrito outro banco de dados internacional denominado SITVITWEB disponível publicamente (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE) que incorpora dados de multimarcaadores, o que permite uma visão global da diversidade genética do MTBC em todo o mundo, com base em amostras clínicas de 105 países. O banco de dados contém padrões de MIRU-VNTR e spoligotipos compartilhados ou de padrões órfãos. SITVITWEB permite atualizar as regras que definem as linhagens genotípicas do MTBC, bem como ter uma nova visão sobre a estrutura da população MTBC e distribuição mundial aos níveis nacional, sub-regional e continental. Em nível evolutivo, os dados compilados podem ser úteis para distinguir a evolução convergente ocasional de genótipos versus a evolução específica da sublinhagens, essencialmente influenciadas pela adaptação ao hospedeiro (Demay et al., 2012).

Um dos potenciais do MIRU-VNTR é a sua aplicabilidade para a criação do banco de dados de genótipos de cepas do MTBC em escala mundial, o que é essencial para bons serviços de vigilância epidemiológica, controle de doenças e análise filogenética (Haddad et al., 2004). A principal desvantagem da técnica MIRU-VNTR é a necessidade de vários oligonucleotídeos para análise de uma única amostra, embora seja essa bateria de oligonucleotídeos que garante a vantagem de ser uma técnica multilocos (Supply, 2005).

1.4.2 Sequenciamento

O sequenciamento direto de determinadas regiões do genoma permitem a identificação de polimorfismo de base única, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Esse polimorfismo é caracterizado pela substituição de uma base nucleotídica na sequência do DNA, ou seja, são variações individuais num ponto particular do genoma, podendo consistir em inserções, deleções ou substituições nucleotídicas. Um SNP pode ser sinônimo (sSNP) ou não-sinônimo (nsSNP): no sSNP, o aminoácido codificado pelo códon que contém o SNP é o mesmo que aquele codificado pelo códon sem o SNP; e no nsSNP o códon modificado codifica um aminoácido diferente daquele codificado pelo códon sem o SNP (Gutacker et al., 2002; Hughes et al., 2002).

Os SNPs têm sido muito úteis para fins epidemiológicos e de diferenciação de micobactérias (Rindi and Garzelli, 2014). Diferentes marcadores moleculares permitem a detecção de SNPs utilizados para distinguir cepas de bactérias e estudos filogenéticos. A determinação de SNPs requer um processo em duas etapas, PCR e sequenciamento (Muwonge et al., 2014; Reddington et al., 2011).

Os laboratórios interessados na identificação molecular de espécies micobacterianas vêm utilizando diferentes regiões de *hsp65*, 16S rDNA, ITS, interpostos entre os genes 16S-23S rRNA, *sodA* e *rpoB* como alvo de amplificação (Huang et al., 2012; Tortoli, 2012). O sequenciamento dessas regiões tem sido muito utilizado para distinção de cepas e construção de árvores filogenéticas, principalmente de forma concatenada (Adékambi and Drancourt, 2004; Kim et al., 2014).

O gene 16S rRNA foi o primeiro e, por muitos anos, o único alvo de sequenciamento genético em bactérias. Várias características únicas deste gene o tornam candidato ideal para análise de mutações. O gene de 16S rRNA, dedicado à função essencial de síntese proteica, está presente em todos os organismos, além disso, é caracterizado por elevada taxa evolutiva capaz de produzir variabilidade interespecífica, mas, ao mesmo tempo, grau de conservação suficiente para minimizar a variabilidade intraespecífica (Huang et

al., 2012; Tortoli, 2012, 2014). No entanto, a diferença no número de cópias desse gene, por exemplo, pode dificultar uma diferenciação mais acurada principalmente entre as micobactérias de crescimento rápido (Tortoli, 2003).

O gene *hsp65*, que está presente em todas as micobactérias, é mais variável do que a sequência do gene 16S rRNA e é, portanto, potencialmente útil para a identificação de espécies geneticamente relacionadas. Variações de sequência do gene *hsp65* podem ser exploradas para identificar tanto micobactérias de crescimento lento e de crescimento rápido ao nível de espécie (Telenti et al., 1993). O sequenciamento do gene *hsp65* é uma abordagem alternativa que tem sido muito utilizada visto que uma estratégia baseada em sequência tem várias vantagens potenciais, pois gera dados inequívocos diretos e pode distinguir linhagens filogenéticas sub-específicas (Ringuet et al., 1999). Com a ampla utilização desse marcador para análises filogenéticas, houve uma grande atualização dos padrões depositados em bancos de dados utilizando essa região como alvo para o sequenciamento, o que permite a discriminação de um grande número de espécies (McTaggart et al., 2010; Ong et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Conhecer as espécies de micobactérias presentes nas três espécies de mamíferos silvestres, *O. bezoarticus*, *S. scrofa* e *N. nasua* do Pantanal sul-mato-grossense.

2.2 Específicos

- Estabelecer relação filogenética e espacial entre estirpes de micobactérias isoladas; e
- Contribuir para estudo e mapeamento voltados para controle de *Mycobacterium*

ARTIGO

Espécies de micobactérias em mamíferos silvestres do Pantanal na América do Sul

Aceito em Setembro de 2014 pela revista *European Journal of
Wildlife Research*

Espécies de micobactérias em mamíferos silvestres do Pantanal na América do Sul

Letícia Alves Gomes Albertti*¹ · Antonio Francisco Souza-Filho¹ ·
Antônio Augusto Fonseca-Júnior² · Michele Eduardo Freitas² ·
Aiesca Oliveira Pellegrin^{1,3} · Namor Pinheiro Zimmermann^{1,3} ·
Walfrido Moraes Tomás³ · Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres^{1,3} ·
Isabella Fontana⁴ · Ana Luiza Alves Rosa Osório¹

¹Laboratório de Micobacteriologia e Biologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Campo Grande, MS CEP 79.070-900, Brasil

²Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil

³Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Resumo A tuberculose bovina é uma doença crônica de importância econômica para a pecuária, mas também pode infectar animais silvestres e ocasionalmente, humanos. Seu principal agente infeccioso é *Mycobacterium bovis*. O presente estudo foi realizado para examinar o possível envolvimento de animais silvestres no ciclo de vida de *M. bovis* no Pantanal e avaliar o seu potencial como reservatório da doença. As amostras de DNA foram obtidas a partir de 14 animais silvestres, sendo 4 veados campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), 9 porcos monteiro (*Sus scrofa*), e um quati (*Nasua nasua*). A região do gene *hsp65*, presente em todas micobactérias, foi amplificada e sete espécies do gênero *Mycobacterium* foram identificadas. *Mycobacterium avium* estava presente em 50% das amostras e em todas as três espécies animais. Espécies de micobactérias não tuberculosas, tais como *Mycobacterium saskatchewanense*, *Mycobacterium parafinicum* e *Mycobacterium parascrofulaceum* também foram detectadas. Uma amostra obtida a partir de um veado exibiu sequências de elevada similaridade com cepa referência de *M. bovis*, o que foi confirmado por genotipagem por meio da análise de 24 loci MIRU-VNTR. Os resultados destacam a necessidade de vigilância a *M. bovis*.

Palavras-chave *Mycobacterium bovis* · Tuberculose Pantanal · reservatório animal silvestre · *Ozotoceros bezoarticus* · *Sus scrofa* · *Nasua nasua*

Introdução

Patógenos que podem ser transmitidos entre diferentes espécies de hospedeiros são de interesse fundamental para saúde pública, conservação, e perspectivas econômicas (Cleaveland et al., 2001). Interações complexas que envolvem seres humanos, animais domésticos, e os animais silvestres podem criar ambientes favoráveis ao surgimento de novas doenças (Daszak et al. 2000; Palmer 2007).

A tuberculose bovina é uma doença crônica causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (Schöning et al. 2013). A maioria das micobactérias são organismos ambientais não patogênicos, descritos como micobactérias não tuberculosas (NTM) (Tortoli 2012). No entanto, algumas espécies causam importantes doenças humanas (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) e doenças veterinárias (*M. bovis*, *M. marinum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *avium*). Mais de 40 espécies de animais silvestres de vida livre na natureza são conhecidas por serem suscetíveis à infecção por *M. bovis*. O búfalo Africano (*Syncerus caffer*), o bisão canadense (*Bison bison*), texugos (*Meles meles*), javalis (*Sus scrofa*), gambás cauda de escova (*Trichosurus vulpecula*), e veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) têm sido implicados como possíveis reservatórios da doença (Corner e Gormley 2012; Cousins e Florisson 2005). O controle da tuberculose e erradicação é baseado em um sistema de diagnóstico e abate de animais infectados (Alvarez et al. 2012), mas esta prática pode ser prejudicada pela existência de reservatórios silvestres.

A região do Pantanal, na porção central da América do Sul, é uma das maiores zonas tropicais úmidas do mundo, e é conhecida por sua diversidade de mamíferos e relacionamentos contínuos entre as espécies em diferentes nichos. A densidade populacional do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal varia de 2,5-9,8 indivíduos/km², enquanto que a densidade bovina é um pouco maior em torno de 16 indivíduos/km² (Rodrigues 1996, Tomás et al. 2001). A expansão de porcos monteiro (*S. scrofa*) também levanta preocupações sobre o controle de doenças compartilhadas com o gado por

causa de sua dieta onívora, hábitos fuçadores, contato com uma vasta gama de animais domésticos e silvestres, e à sua susceptibilidade a infecções por micobactérias (Boadella et al. 2011). Porcos monteiro têm uma grande densidade populacional no Pantanal (entre 1,58 e 11 indivíduos/km²), enquanto que quatis (*Nasua nasua*) tem uma densidade populacional estimada em 9-16,6 indivíduos/km² (Desbiez e Borges 2010). Todos estes mamíferos têm uma relação simpátrica com o gado, compartilhando os mesmos recursos de comida e água. Os dados de prevalência da tuberculose bovina nos rebanhos da região do Pantanal ainda são desconhecidos.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a distribuição espacial e genotipar espécies de micobactérias isoladas de animais silvestres da região do Pantanal sul-mato-grossense.

Materiais e métodos

Área de estudo e coleta de amostras

Vinte e seis animais silvestres foram capturados em locais compartilhados pelo gado; na tabela 1 estão registradas localizações por GPS daquelas amostras de BAAR (Apêndice B). Veados campeiro e porcos monteiro foram capturados usando dardos anestésicos. Quatis foram capturados por meio de armadilhas *Tomahawk*. Depois de serem completamente sedados, um *swab* estéril foi introduzido na região orofaríngea dos veados campeiro e quatis; uma amostra foi recolhida e armazenada para análises posteriores. Os linfonodos retrofaríngeos de porcos monteiro foram removidos durante a necropsia de animais sacrificados (para detalhes, consulte Apêndice A).

Cultura de tecidos e extração de DNA

Linfonodos retrofaríngeos de porcos monteiro foram maceradas com areia estéril e descontaminadas pelo método de Petroff. Finalmente, 2-3 gotas dos inóculos foram transferidos para meio Stonebrink e incubadas durante 12 semanas a 37°C. Amostras de orofaringe de veado campeiro e quati foram diretamente semeadas em meio Stonebrink. De 26 amostras, apenas 14

revelaram BAAR, demonstrados pela coloração de Ziehl-Neelsen, identificadas como micobactérias. O DNA genômico foi extraído por termólise de colônias de BAAR ressuspensionado em tampão TE e o sobrenadante foi utilizado diretamente como molde (para mais detalhes, consulte Apêndice A).

Amplificação por PCR e sequenciamento

Um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* foi amplificado usando iniciadores já descritos (Shinnick 1987; Telenti et al. 1993). O produto da PCR foi purificado a partir do gel utilizando o kit de extração de DNA *AxyPrep* (Axygen Biosciences, EUA). O produto da PCR foi utilizado como um molde para sequenciamento utilizando os iniciadores de PCR com o Kit *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems, EUA), e os produtos de reação foram analisados no ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA). Para construir a árvore filogenética, várias cepas de referência foram obtidas a partir do *GenBank*: *M. tuberculosis* (número de acesso *GenBank*: AY299144.1), *M. avium* e *M. bovis* (cepa de referência do Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO/MG). A sequência correspondente de *Nocardia farcinica* ATCC 3308 (*GenBank* número de acesso: DQ789016.1) foi adicionado como um grupo filogenético externo (para mais detalhes, consulte Apêndice A).

MIRU-VNTR

Uma amostra de veado foi amplificada com 24 oligonucleotídeos relativos ao MIRU-VNTR, como descrito por (Supply, 2005; Supply et al. 2006). O tamanho dos fragmentos do produto amplificado foi comparado com o marcador molecular, e o número de pares de base foi determinado para cada um dos 24 *loci*. O perfil genético do isolado foi comparado com o banco de dados de referência do aplicativo web MIRU-VNTR_{plus} (<http://www.miru-vntrplus.org>). Cepas de referência do aplicativo web foram utilizadas para construir uma árvore filogenética pelo método *neighbor-joining*. O nome das cepas e números de referência utilizados foram: *M. bovis* (7072/01, 751/01, 4258/00, 7540/01, 951/01, 8490/00); *M. tuberculosis* Beijing (3272/02, 3309/02, 4436/02); *M. tuberculosis* Camarões (5400/02), *M. tuberculosis* H37Rv (9679/00); *M. africanum* 1 (1473-1402, 8303/02, 5398/02); *M. africanum* 2 (5383/02,

70485/01, 9550/00); *M. caprae* (8986/99, 11.443 / 99, 9577/99); *M. canettii* (3040/99); *M. microti* (8473/00, 1479-1400), e *M. pinnipedi* (7739/01).

Resultados e discussão

Sete espécies do gênero *Mycobacterium* foram detectadas e identificadas em 14 diferentes indivíduos de 3 espécies diferentes (veado campeiro, porco monteiro e quati). Cada animal mostrou evidência de infecção por ao menos um *Mycobacterium* sp. A alta proporção de espécies de *M. avium* (MAC), 50% das amostras, isoladas dos animais capturados pode ser explicada pela contínua interação entre porcos monteiro, veados campeiro, pássaros e os bovinos na região do Pantanal, onde há intenso compartilhamento de fontes de alimento e água. A distribuição de *M. avium* entre os animais silvestres capturados foi independente das espécies hospedeiras e do local em que foi coletado, provavelmente devido à capacidade destas bactérias de colonizar diferentes habitats (Biet et al 2005;. Whittington et al. 2004) (ver Apêndice D). As espécies do MAC podem ser isoladas a partir de uma ampla variedade de fontes, incluindo pântanos (Kirschner et al. 1992); água potável (von Reyn et al. 2002), insetos (Fischer et al. 2001, 2003), e protozoários (Whittington et al. 2001).

A distância genética entre os filotipos de *M. avium* identificados revelou que compartilhavam identidade genética bem próxima (ver Apêndice C), e todas as amostras ficaram agrupadas com a sequência de referência do GenBank (*M. avium* ATCC). Como esperado, uma série de micobactérias ambientais foram detectadas, devido sua ampla distribuição na água e no solo (Castillo-Rodal et al. 2012). Todas as micobactérias classificadas como espécies ambientais, *M. saskatchewanense*, *M. paraffinicum*, e *M. parascrofulaceum*, na análise filogenética ficaram intimamente agrupadas (ver Apêndice C), confirmando suas identidades como membros do grupo das NTM. A micobactéria ambiental, *Mycobacterium asiaticum* foi detectada em um veado campeiro, enquanto todas as demais micobactérias ambientais foram detectadas em porcos monteiro (4/5).

No estudo, o isolamento de um membro do complexo *M. tuberculosis* em um veado foi motivo de preocupação por causa de seu impacto sobre a saúde humana e dos animais. Embora cada espécie de micobactéria apresente tropismo hospedeiro-específico o complexo *M. tuberculosis* é caracterizado por uma elevada similaridade de sequência ao nível de nucleótidos, com 99,9% de identidade entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Pelas análises no *BLASTn*, a amostra isolada de veado apresentou 100% de similaridade com as sequências *M. bovis/M. tuberculosis* do banco de dados, dificultando a interpretação de sua real identidade. Devido à baixa resolução da sequência de aminoácidos codificada pelo gene *hsp65* e seu baixo poder discriminatório (Huang et al. 2012; Tortoli 2012), a técnica MIRU-VNTR, que analisa 24 *loci* distintos, favorecendo assim maior discriminação entre espécies do MTBC (Frothingham e Meeker-O'Connell 1998; Kremer et al. 2005), foi usada para que a identidade da amostra de veado fosse confirmada como sendo *M. bovis* (ver Apêndice E). Os animais silvestres podem agir como hospedeiros de manutenção e hospedeiros *spillover*, e ambos atuam como vetores de doenças para animais domésticos. Mesmo em países desenvolvidos, o sucesso da erradicação da doença no rebanho é dificultado pela presença de animais silvestres reservatórios de *M. bovis*, que em algumas áreas podem ser responsáveis pela reintrodução da doença e aumento no número de casos de tuberculose bovina (Michel et al. 2010). Este estudo deverá ajudar com iniciativas destinadas a calcular e mitigar o possível risco de animais silvestres reservatórios como agentes disseminadores do patógeno. Pesquisas amostrando um maior número de espécies hospedeiras e abrangendo áreas geográficas maiores ajudarão a fornecer dados robustos sobre a presença e distribuição de *M. bovis*.

Referências

- Alvarez J, Bezos J, Juan L, Vordermeier M, Rodriguez S, Fernandez-de-Mera IG, Mateos A, Domínguez L (2012) Diagnosis of tuberculosis in camelids: old problems, current solutions and future challenges. *Transbound Emerg Dis* 59:1–10
- Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (mac). *Vet Res* 36:411–436
- Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Jaroso R, Carta T, Garrido JM, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C (2011) Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa*). *J Vet Diagn Investig* 23:77–83
- Castillo-Rodal AI, Mazari-Hiriart M, Lloret-Sánchez LT, Sachman-Ruiz B, Vinuesa P, López-Vidal Y (2012) Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:683–694
- Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH (2001) Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:991–999
- Corner LA, Gormley E (2012) Mycobacterial infections in multiple species: implications for diagnosis and control. *Vet J* 191:141–142
- Cousins DV, Florisson N (2005) A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev Sci Tech* 24:1039–1059
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443–449
- Desbiez ALJ, Borges PAL (2010) Density, habitat selection and observations of south american coati *Nasua nasua* in the central region of the Brazilian Pantanal wetland. *Small Carniv Conserv* 42:14–18
- Fischer O, Mátlová L, Dvorská L, Svástová P, Bartl J, Melichárek I, Weston RT, Pavlík I (2001) Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med Vet Entomol* 15:208–211
- Fischer OA, Matlova L, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Melicharek I, Bartos M, Pavlik I (2003) Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. *Vet Microbiol* 91:325–338
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144(Pt 5):1189–1196
- Huang CC, Chen JH, Hu ST, Chiou CS, Huang WC, Hsu JY, Lu JJ, Shen GH (2012) Combined rpoB duplex pcr and hsp65 pcr restriction fragment length polymorphism with capillary electrophoresis as an effective algorithm for identification of mycobacterial species from clinical isolates. *BMC Microbiol* 12:137

- Kirschner RA, Parker BC, Falkinham JO (1992) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am Rev Respir Dis* 145:271–275
- Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D (2005) Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with is 6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 43:314–320
- Michel AL, Müller B, van Helden PD (2010) *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet Microbiol* 140:371–381
- Palmer MV (2007) Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol* 315:195–215
- Rodrigues FHG (1996) Historia natural e biologia comportamental do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) em cerrado do Brasil central. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP
- Schöning JM, Cerny N, Prohaska S, Wittenbrink MM, Smith NH, Bloemberg G, Pewsner M, Schiller I, Origi FC, Ryser-Degiorgis MP (2013) Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. *PLoS One* 8:e54253
- Shinnick T (1987) The 65-kilodalton antigen of mycobacterium-tuberculosis. *J Bacteriol* 169:1080–1088
- Supply P (2005) Multilocus variable number tandem repeat genotype of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 73. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lisle
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44:4498–4510
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain-reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175–178
- Tomás WM, McShea W, Miranda GHBd, Moreira JR, Mourao G, Borges PAL (2001) A survey of a pampa deer, *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* (Arctiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal wetland, Brasil, using distance sampling technique. *Anim Biodivers Conserv* 101–106
- Tortoli E (2012) Phylogeny of the genus mycobacterium: many doubts, few certainties. *Infect Genet Evol* 12:827–831

- von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR, Ristola MA, Waddell RD, Tvaroha SM, Samore M, Hirschhorn LR, Lumio J, Lein AD, Grove MR, Tosteson AN (2002) Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in aids. *J Infect* 44:166–170
- Whittington RJ, Lloyd JB, Reddacliff LA (2001) Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Vet Microbiol* 81:273–279
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA(2004) Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 70:2989–3004

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão das interações entre animais silvestres, animais domésticos e o homem com relação às microbactérias é limitada. Os autores Albertti et al. (2014) mostraram a presença de sete espécies de micobactérias distintas. Diversas espécies do MAC assim como espécies de NTM têm demonstrado uma capacidade infecciosa em humanos, tem sido associada com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em pacientes com alterações pulmonares pré-existente ou predisposições genéticas. Apesar de serem considerados patógenos oportunistas, é cada vez mais frequente o relato de casos clínicos com infecção por NTM e MAC.

Nos animais, as espécies do MAC causam tuberculose em várias espécies de aves, também causam lesões granulomatosas nos linfonodos do trato gastrointestinal de suínos, a linfadenite granulomatosa, que leva a sérias perdas no abate desses animais. Embora, a maioria das espécies desse complexo não seja patogênica para os bovinos e bubalinos, provocam reações inespecíficas à tuberculinização, dificultando o diagnóstico da tuberculose nessas espécies. Cabe ainda destacar que nos bovinos a subespécie *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) causa a paratuberculose, doença intestinal crônica, conhecida como doença de Johne. Essa subespécie também tem sido isolada de tecido de humanos com doença de Crohn.

A identificação de um isolado proveniente de um veado campeiro como pertencente ao MTBC é a constatação mais preocupante, devido ao impacto das espécies desse complexo para o rebanho bovino e seres humanos. A identificação realizada neste estudo por meio de sequenciamento e MIRU-VNTR sucedeu análise por PCR cerca de um ano antes quando o mesmo animal apresentou positividade para MTBC, por meio de amplificação das sequências alvo (RvD1-Rv2031c) a partir dos iniciadores JB21 e JB22.

Neste estudo, o veado campeiro foi recapturado, o swab de orofaringe novamente realizado e o cultivo em meio de Stonebrink revelou presença de BAAR. O DNA de colônias foi submetido à amplificação por iniciadores da

região *hsp65* e sequenciados. Pela análise no *BLASTn*, essa amostra gerou 100% de similaridade com as espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG. A dificuldade em discriminar estas espécies era esperada devido à similaridade em nível nucleotídico de 99,9% ou mais, entre essas duas espécies do MTBC. A necessidade de uma maior elucidação sobre a identidade dessa espécie isolada culminou na escolha de outra metodologia de tipagem genética – MIRU-VNTR, confirmando sua identidade como da espécie *M. bovis*.

Os autores Albertti et al. (2014) compararam o perfil genético de *M. bovis* encontrado no veado campeiro com perfis já identificados (MIRU-VNTR com 24 iniciadores) a partir de 55 isolados de BAAR obtidos de bovinos reagentes a tuberculinização (dados não mostrados). Não houve qualquer identidade com os 22 perfis genéticos encontrados por Souza-Filho (2013), em quatro estados brasileiros, incluindo Mato Grosso do Sul.

Sabe-se que a movimentação de animais doentes acontece devido à dificuldade no diagnóstico da tuberculose, ou por falhas no saneamento dos focos e no controle de trânsito animal. Além disso, pode ocorrer reintrodução a partir de animais silvestres. Apesar da falta de dados epidemiológicos da tuberculose bovina na região do Pantanal, o estudo da relação simpátrica entre rebanhos bovinos e animais silvestres é de extrema importância para a compreensão da disseminação e manutenção do patógeno entre essas espécies de animais.

Mesmo em países desenvolvidos, o sucesso da erradicação da tuberculose no rebanho bovino é dificultado pela presença de animais silvestres reservatórios de *M. bovis*, que em algumas áreas podem ser responsáveis pela reintrodução da doença e aumento no número de casos. O presente estudo pode contribuir para análise do possível risco de animais silvestres como agentes disseminadores de micobactérias no Pantanal sul-mato-grossense, especialmente a espécie *M. bovis*, aprimorando as estratégias de controle e erradicação da tuberculose bovina.

4 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais envolvendo amostragem planejada a partir de bovinos e animais silvestres podem fornecer dados robustos sobre a presença e distribuição de micobactérias na região do Pantanal, além de investigar se as espécies dos patógenos são geneticamente relacionadas. Tais estudos deverão contemplar abordagens direcionadas ao sequenciamento de um fragmento gênico maior ou até mesmo do hsp65 inteiro.

Para a análise de possíveis fatores associados a ocorrência de tuberculose poderão ser utilizados estudos observacionais de caso-controle a partir de dados colhidos em questionários epidemiológicos aplicados nas propriedades, onde bovinos vivem em simpatia com animais silvestres. Os questionários deverão ser elaborado de modo a propiciar a verificação da ausência ou presença de algumas práticas de manejo que poderiam atuar como possíveis fatores de risco para a tuberculose animal.

REFERÊNCIAS

- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S.H., and Hunter, P.R. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 14, 401-410.
- Adékambi, T., and Drancourt, M. (2004). Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2095-2105.
- Alho, C. (2008). Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology* 68, 957-966.
- Allix-Beguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., and Niemann, S. (2008). Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 46.
- Alvarez, J., Bezos, J., Juan, L., Vordermeier, M., Rodriguez, S., Fernandez-de-Mera, I.G., Mateos, A., and Domínguez, L. (2012). Diagnosis of tuberculosis in camelids: old problems, current solutions and future challenges. *Transbound Emerg Dis* 59, 1-10.
- Aranaz, A., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., RodriguezFerri, E., Bunschoten, A., VanEmbden, J., *et al.* (1996). Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: A tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2734-2740.
- Biek, R., O'Hare, A., Wright, D., Mallon, T., McCormick, C., Orton, R.J., McDowell, S., Trewby, H., Skuce, R.A., and Kao, R.R. (2012). Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathog* 8, e1003008.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., and Guilloteau, L.A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 36, 411-436.
- Boadella, M., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Jaroso, R., Carta, T., Garrido, J.M., Vicente, J., de la Fuente, J., and Gortázar, C. (2011). Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *J Vet Diagn Invest* 23, 77-83.
- Brasil (2006a). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e a Tuberculose Animal (PNCEBT), P.e.A. Ministério de Agricultura, ed. (Brasília), pp. 184.
- Brasil (2006b). Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCBT), M.d.A.P.e. Abastecimento, ed. (Brasília), pp. 184.

- Butler, W.R., and Guthertz, L.S. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 14, 704-726, table of contents.
- Carvalho, I.A., Silva, A., Jr., Campos, V.E., and Moreira, M.A. (2009). Short communication: detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. *J Dairy Sci* 92, 5408-5410.
- Castillo-Rodal, A.I., Mazari-Hiriart, M., Lloret-Sánchez, L.T., Sachman-Ruiz, B., Vinuesa, P., and López-Vidal, Y. (2012). Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 683-694.
- Chan, A.W., Kabbani, S., Staton, G., and Kraft, C.S. (2014). *Mycobacterium paraffinicum* Causing Symptomatic Pulmonary Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 1281-1283.
- Cleaveland, S., Laurenson, M.K., and Taylor, L.H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 991-999.
- Collins, D.M. (2011). Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 151, 2-7.
- Corner, L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology* 112, 303-312.
- Corner, L.A. (1994). POST-MORTEM DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIUM-BOVIS INFECTION IN CATTLE. *Veterinary Microbiology* 40, 53-63.
- Corner, L.A., and Gormley, E. (2012). Mycobacterial infections in multiple species: implications for diagnosis and control. *Vet J* 191, 141-142.
- Corner, L.A., O'Meara, D., Costello, E., Lesellier, S., and Gormley, E. (2012). The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Vet J* 194, 166-172.
- Cousins, D., and Dawson, D. (1999). Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 3, 715-721.
- Cousins, D.V., and Florisson, N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev Sci Tech* 24, 1039-1059.
- Cunha, M.V., Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J.R., Aranha, J.M., Vieira-Pinto, M., and Botelho, A. (2012). Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. *Res Vet Sci* 92, 225-235.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., and Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D., Millet, J., Mokrousov, I., Sola, C., Zozio, T., and Rastogi, N. (2012). SITVITWEB--a publicly available

international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 12, 755-766.

Desbiez, A.L.J., and Borges, P.A.L. (2010). Density, habitat selection and observations of South American Coati *Nasua nasua* in the central region of the Brazilian Pantanal wetland. *Small Carnivore Conservation* 42, 14-18.

Devallois, A., Horgen, L., Sola, C., and Rastogi, N. (1998). Molecular typing of mycobacteria. *Pathologie Biologie* 46, 625-636.

El Khéchine, A., Couderc, C., Flaudrops, C., Raoult, D., and Drancourt, M. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* 6, e24720.

El-Sayed, A., Natur, S., Abdou, N.-E.M.I., Salem, M., Hassan, A., and Zschöck, M. (2013). Genotyping of *Mycobacterium avium* field isolates based on repetitive elements. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1, 36-42.

Ereqat, S., Nasereddin, A., Levine, H., Azmi, K., Al-Jawabreh, A., Greenblatt, C.L., Abdeen, Z., and Bar-Gal, G.K. (2013). First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2417.

Escobar-Escamilla, N., Ramírez-González, J.E., González-Villa, M., Torres-Mazadiego, P., Mandujano-Martínez, A., Barrón-Rivera, C., Bäcker, C.E., Fragoso-Fonseca, D.E., Olivera-Díaz, H., Alcántara-Pérez, P., *et al.* (2014). hsp65 Phylogenetic Assay for Molecular Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Isolated in Mexico. *Archives of Medical Research* 45, 90-97.

Fischer, O., Mátlová, L., Dvorská, L., Svástová, P., Bartl, J., Melichárek, I., Weston, R.T., and Pavlík, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med Vet Entomol* 15, 208-211.

Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., and Pavlik, I. (2003). Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. *Vet Microbiol* 91, 325-338.

Galagan, J.E. (2014). Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet* 15, 307-320.

Gopinath, K., and Singh, S. (2010). Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Negl Trop Dis* 4, e615.

Gortazar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Garrido, J., Aranaz, A., and de la Fuente, J. (2011). Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet Microbiol* 151, 170-178.

Gutacker, M.M., Smoot, J.C., Migliaccio, C.A.L., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. (2002). Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162, 1533-1543.

Gómez, N.A. (2009). [Non-tuberculous mycobacteria: an emerging disease?]. *An Pediatr (Barc)* 71, 185-188.

- Haddad, N., Masselot, M., and Durand, B. (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science* 76, 1-18.
- Hamilton, S., Sippel, S., and Melack, J. (1996). Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. *Archiv Fur Hydrobiologie* 137, 1-23.
- Huang, C.C., Chen, J.H., Hu, S.T., Chiou, C.S., Huang, W.C., Hsu, J.Y., Lu, J.J., and Shen, G.H. (2012). Combined rpoB duplex PCR and hsp65 PCR restriction fragment length polymorphism with capillary electrophoresis as an effective algorithm for identification of mycobacterial species from clinical isolates. *BMC Microbiol* 12, 137.
- Hughes, A.L., Friedman, R., and Murray, M. (2002). Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1342-1346.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., *et al.* (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907-914.
- Kim, B.R., Kim, J.M., Kim, B.J., Jang, Y., Ryoo, S., and Kook, Y.H. (2014). Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) in South Korea by sequencing analysis targeting hsp65, rpoB and 16S rRNA genes. *Vet Microbiol* 173, 385-389.
- Kirschner, R.A., Parker, B.C., and Falkinham, J.O. (1992). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am Rev Respir Dis* 145, 271-275.
- Kremer, K., Au, B.K., Yip, P.C., Skuce, R., Supply, P., Kam, K.M., and van Soolingen, D. (2005). Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 43, 314-320.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W., Hermans, P., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B., Riley, L., Yakrus, M., *et al.* (1999). 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* 37, 2607-2618.
- Mayer, F.Q., Cerva, C., Driemeier, D., da Cruz, C.E., Loiko, M.R., Coppola, M.e.M., Cibulski, S., and Bertagnoli, A.C. (2012). *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu tajacu*): insights on tuberculosis wild reservoirs. *Vet Microbiol* 160, 549-551.
- McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., and Ryan, F. (2010). Evaluation of *Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Spoligotyping for Genotyping of Mycobacterium bovis* Isolates and a

Comparison with Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 48.

- McTaggart, L.R., Richardson, S.E., Witkowska, M., and Zhang, S.X. (2010). Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48, 4525-4533.
- Mostowy, S., and Behr, M.A. (2005). The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chest Med* 26, 207-216, v-vi.
- Muwonge, A., Oloya, J., Kankya, C., Nielsen, S., Godfroid, J., Skjerve, E., Djønné, B., and Johansen, T.B. (2014). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from humans, cattle and pigs in the Uganda cattle corridor using VNTR analysis. *Infect Genet Evol* 21, 184-191.
- Nugent, G. (2011). Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. *Vet Microbiol* 151, 34-42.
- Nugent, G., Whitford, J., and Young, N. (2002). Use of released pigs as sentinels for *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis* 38, 665-677.
- OIE (2012). *Terrestrial Animal Health Code*, 21th edn.
- Ong, C.S., Ngeow, Y.F., Yap, S.F., and Tay, S.T. (2010). Evaluation of PCR-RFLP analysis targeting *hsp65* and *rpoB* genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. *J Med Microbiol* 59, 1311-1316.
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., Waters, W.R., Gortázar, C., and Corner, L.A. (2012). *Mycobacterium bovis*: A Model Pathogen at the Interface of Livestock, Wildlife, and Humans. *Vet Med Int* 2012, 236205.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., and Whipple, D.L. (2004). Shared feed as a means of deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis* 40, 87-91.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., and Hermoso de Mendoza, J. (2003). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* 97, 123-133.
- Reddington, K., O'Grady, J., Dorai-Raj, S., Maher, M., van Soolingen, D., and Barry, T. (2011). Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 49, 651-657.
- Rindi, L., and Garzelli, C. (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol* 21, 375-383.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J.L., and Pierre-Audigier, C. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 37, 852-857.
- Rodrigues, F.H.G. (1996). Historia natural e biologia comportamental do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) em cerrado do Brasil Central. In Programa de Pós-Graduação em Ecologia (Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas).

- Rodriguez-Campos, S., Smith, N.H., Boniotti, M.B., and Aranaz, A. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*.
- Rodriguez-Campos, S., Smith, N.H., Boniotti, M.B., and Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97, *Supplement*, S5-S19.
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., and Naser, S.A. (2000). Use of short-term culture for identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol Infect* 6, 303-307.
- Schöning, J.M., Cerny, N., Prohaska, S., Wittenbrink, M.M., Smith, N.H., Bloemberg, G., Pewsner, M., Schiller, I., Origgi, F.C., and Ryser-Degiorgis, M.P. (2013). Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and liechtenstein. *PLoS One* 8, e54253.
- Smith, N.H., Gordon, S.V., de la Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., and Hewinson, R.G. (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of Mycobacterium bovis. *Nat Rev Microbiol* 4, 670-681.
- Soriano, B., Oliveira, H.d., Catto, J., Comastri Filho, J., Galdino, S., and Salis, S. (1997). Plano de utilização da fazenda Nhumirim (Embrapa - CPAP: Embrapa - CPAP), pp. 72.
- Supply, P. (2005). Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* (Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lisle), pp. 73.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., *et al.* (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 44, 4498-4510.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., and Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology* 26, 991-1003.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E.C., and Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 175-178.
- Thoen, C.O., Lobue, P.A., Enarson, D.A., Kaneene, J.B., and de Kantor, I.N. (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Vet Ital* 45, 135-181.
- Tomás, W.M., McShea, W., Miranda, G.H.B.d., Moreira, J.R., Mourao, G., and Borges, P.A.L. (2001). A survey of a pampa deer, *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* (Arctiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal wetland, Brazil, using distance sampling technique. *Animal Biodiversity and Conservation* 24.1, 101-106.

- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16, 319-354.
- Tortoli, E. (2012). Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. *Infect Genet Evol* 12, 827-831.
- Tortoli, E. (2014). Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* 27, 727-752.
- Tubelis, D.P., and Tomás, W.M. (2003). Bird species of the Pantanal wetland, Brazil. *Ararajuba* 11, 5-37.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62.
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., and Harmsen, D. (2010). MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research* 38, W326-W331.
- Whittington, R.J., Lloyd, J.B., and Reddacliff, L.A. (2001). Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Vet Microbiol* 81, 273-279.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Beguec, C., Woelbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Ruesch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., *et al.* (2008). Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Plos Pathogens* 4.
- Zamarioli, L.A., Coelho, A.G.V., Pereira, C.M., Nascimento, A.C.C., Ueki, S.Y.M., and Chimara, E. (2008). Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 34, 590-594.

APÊNDICE A

Material e Métodos

Área de Estudo e Coleta de Amostras

O trabalho de campo foi realizado em 14 locais (APÊNDICE D) em duas sub-regiões do Pantanal (Leque-do-Taquari e Nhecolândia) (Da Silva e Abdon, 1998, Hamilton, et al. 1996). Os locais de captura foram registrados por GPS (Sistema de Posicionamento Global). Vinte e seis animais foram capturados em locais compartilhados pelo gado; as localizações geo-referenciadas de animais amostrados que revelaram presença de BAAR estão apresentadas na Tabela 1.

Veados campeiro e porcos monteiro foram capturados utilizando dardos anestésicos de acordo com o *Animal Care and Use Committee* (Committee, 1998), seguindo as orientações e disposições do IBAMA, Brasil (número da licença 20.029-1; 35.296-1). Depois de serem completamente sedados, um swab estéril foi introduzido na região da orofaringe através da boca dos veados campeiro; a amostra recolhida foi armazenada sob refrigeração para análise posterior. Os linfonodos retrofaríngeos de porcos monteiro foram retirados durante a necropsia de animais sacrificados. Quatis foram capturados por meio de armadilhas *Tomahawk* e após anestesia amostras de swab de orofaringe foram coletadas.

As amostras e extração de DNA

Linfonodos retrofaríngeos de porcos monteiro foram homogeneizados em 2 ml de água estéril, centrifugada a 3000 rpm durante 15 min; o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de água estéril. As amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff, e cultivadas em meio de Stonebrink. Amostras de orofaringe de veado campeiro e quati foram diretamente cultivados em meio Stonebrink. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C por até 90 dias. As colônias foram verificadas quanto a álcool-ácido resistência por meio da coloração de Ziehl-Neelsen. De 26 amostras, apenas 14 foram BAAR. Para a extração de DNA, colônias BAAR

foram suspensas em 1,5 mL de tampão TE. As células foram lisadas e inativadas pelo calor num banho seco a 90 °C durante 30 minutos, e, em seguida, congeladas a -20 °C.

Amplificação por PCR e sequenciamento

Um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* foi amplificado utilizando iniciadores descritos por Telenti, et al. 1993. Uma amostra de 10 µl do produto amplificado foi submetida a electroforese e a banda de DNA foi excisada do gel e purificada utilizando *AxyPrep DNA Gel Extraction Kit* (Axygen Biosciences, EUA). O produto purificado foi utilizado como um molde para sequenciamento utilizando os iniciadores de PCR com o *Big Dye Terminator Sequencing Kit* (Applied Biosystems, EUA), e os produtos da reação foram analisados num ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA). Foram determinadas as sequências de ambas as vertentes. O alinhamento múltiplo de sequência foi realizado com *Clustal W* usando o software MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011). As identidades putativas das sequências alinhadas foram determinadas usando *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A identidade de cada amostra foi considerada válida quando superior a 98%. Para construir uma árvore filogenética várias cepas de referência foram obtidas a partir do GenBank: *M. tuberculosis* (GenBank número de acesso: AY299144.1), *M. avium* e *M. bovis* (cepa referência do Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO/MG). A sequência correspondente de *Nocardia farcinica* ATCC 3308 (número de acesso GenBank: DQ789016.1) foi adicionado como o grupo filogenético externo. Com base nestas sequências de aminoácidos, uma árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* do software MEGA. O grau de confiança na ramificação filogenética foi avaliado usando 1000 repetições de *bootstrap*.

MIRU-VNTR

Uma amostra que não pode ser identificada de forma precisa, utilizando o método de amplificação do fragmento do gene *hsp65* foi amplificada com 24 oligonucleótidos relacionados com MIRU-VNTR, como descrito por Supply 2005, 2006. O comprimento do fragmento de produto amplificado foi

comparado com o marcador molecular, e o número de pares de bases para cada *locus* foi determinado. O perfil genético de cada isolado foi comparado com o banco de dados de referência do aplicativo web MIRU-VNTR*plus* (<http://www.miru-vntrplus.org>). Cepas de referência a partir do aplicativo web foram utilizadas para construir uma árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining*. O nome das amostras e os números de referência utilizados foram: *M. bovis* (7072/01, 751/01, 4258/00, 7540/01, 951/01, 8490/00); *M. tuberculosis* Beijing (3272/02, 3309/02, 4436/02); *M. tuberculosis* Camarões (5400/02), *M. tuberculosis* H37Rv (9679/00); *M. africanum* 1 (1473-1402, 8303/02, 5398/02); *M. africanum* 2 (5383/02, 70485/01, 9550/00); *M. caprae* (8986/99, 11443/99, 9577/99); *M. canettii* (3040/99); *M. microti* (8473/00, 1479-1400) e *M. pinnipedi* (7739/01).

APÊNDICE B

Tabela 1 Os animais silvestres capturados e testados para micobactérias nas sub-regiões Leque-do-Taquari e Nhecolândia do Pantanal

<i>ID Animal</i>	<i>Espécie silvestre</i>	<i>Localização Geográfica</i>	<i>Nº de Animais</i>	<i>Nº de BAAR</i>	<i>Especiões de micobactérias</i>
Nn	<i>Nasua nasua</i>	18° 54' 06.69" S and 56° 38' 57.19" W	2	1	<i>M. avium</i>
Ob	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	19° 02' 05.83" S and 56° 47' 32.07" W	8	4	<i>M. asiaticum</i>
		19° 02' 32.59" S and 56° 35' 21.11" W			<i>M. bovis</i>
		19° 01' 53.06" S and 56° 35' 50.70" W			<i>M. avium</i>
		18° 54' 06.69" S and 56° 38' 57.19" W			<i>M. parascrofulaceum</i>
Ss	<i>Sus scrofa</i>	18° 59' 09.99" S and 56° 45' 19.87" W	16	9	<i>M. avium</i>
		19° 06' 06.40" S and 56° 30' 27.39" W			<i>M. parafinicum</i>
		18° 59' 16.25" S and 56° 46' 08.18" W			<i>M. avium</i>
		18° 59' 46.96" S and 56° 46' 28.59" W			<i>M. nonchromogenicum</i>
		18° 59' 50.92" S and 56° 46' 42.60" W			<i>M. saskatchewanense</i>
		19° 05' 01.50" S and 56° 30' 49.71" W			<i>M. saskatchewanense</i>
		19° 05' 03.22" S and 56° 30' 48.23" W			<i>M. avium</i>
		19° 03' 51.62" S and 56° 32' 32.28" W			<i>M. avium</i>
		19° 08' 27.09" S and 56° 29' 58.12" W			<i>M. avium</i>

APÊNDICE C

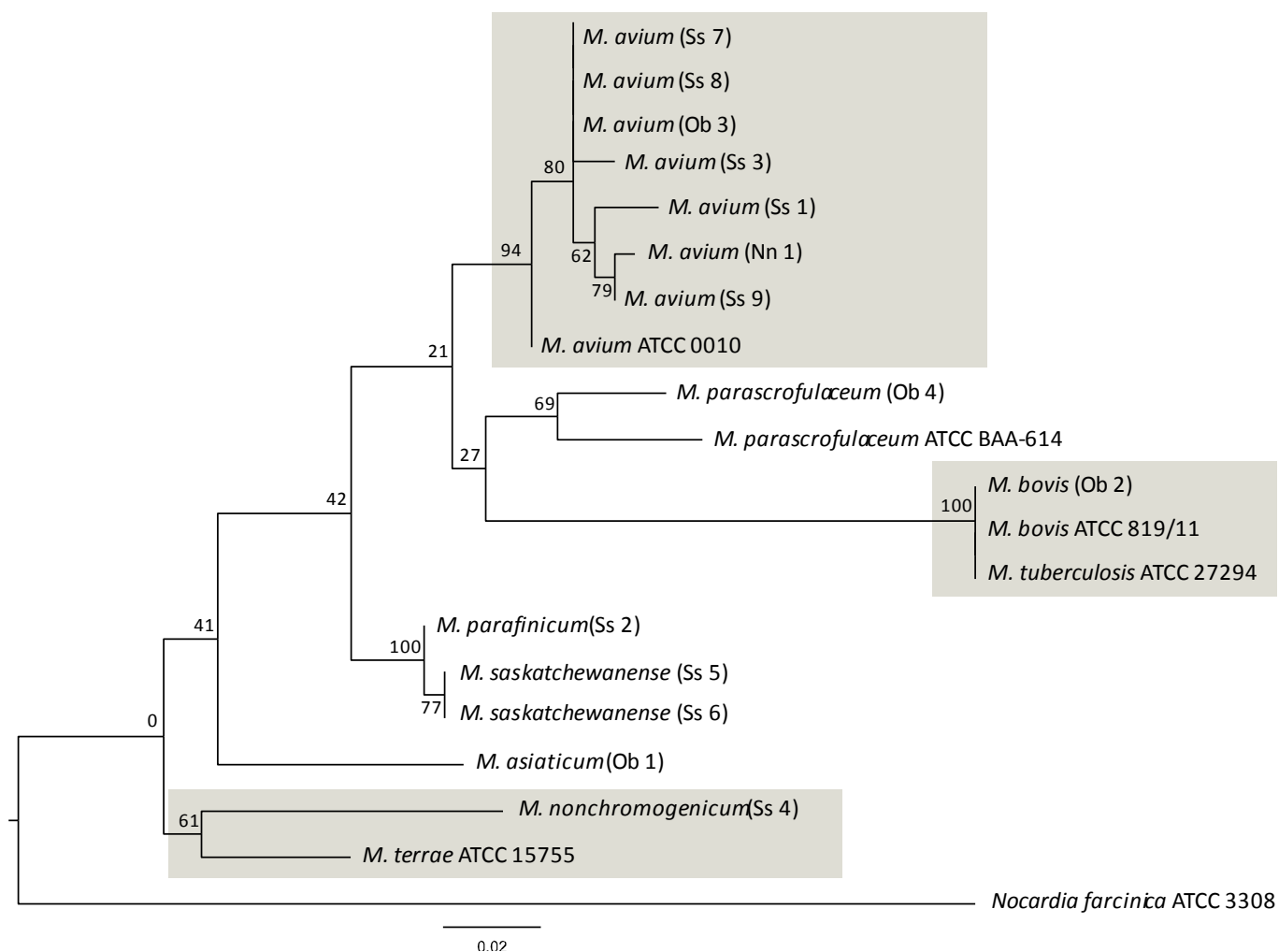


Figura 1 Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos codificada pelo gene *hsp65* foi construída utilizando o método *neighbor-joining* e o pacote MEGA 5.1. O significado dos ramos é indicado por valores de *bootstrap* calculados por 1000 repetições. Sequências obtidas neste trabalho são indicadas entre parênteses (Ss - *Sus scrofa*, Ob - *Ozotoceros bezoarticus*, Nn - *Nasua nasua* e o número de cada indivíduo). Sequências de cepas de referência são indicadas pela sigla ATCC após o nome científico. Três grupos principais estão destacados em cinza: complexo *M. terrae*, MAC e MTBC.

APÊNDICE D

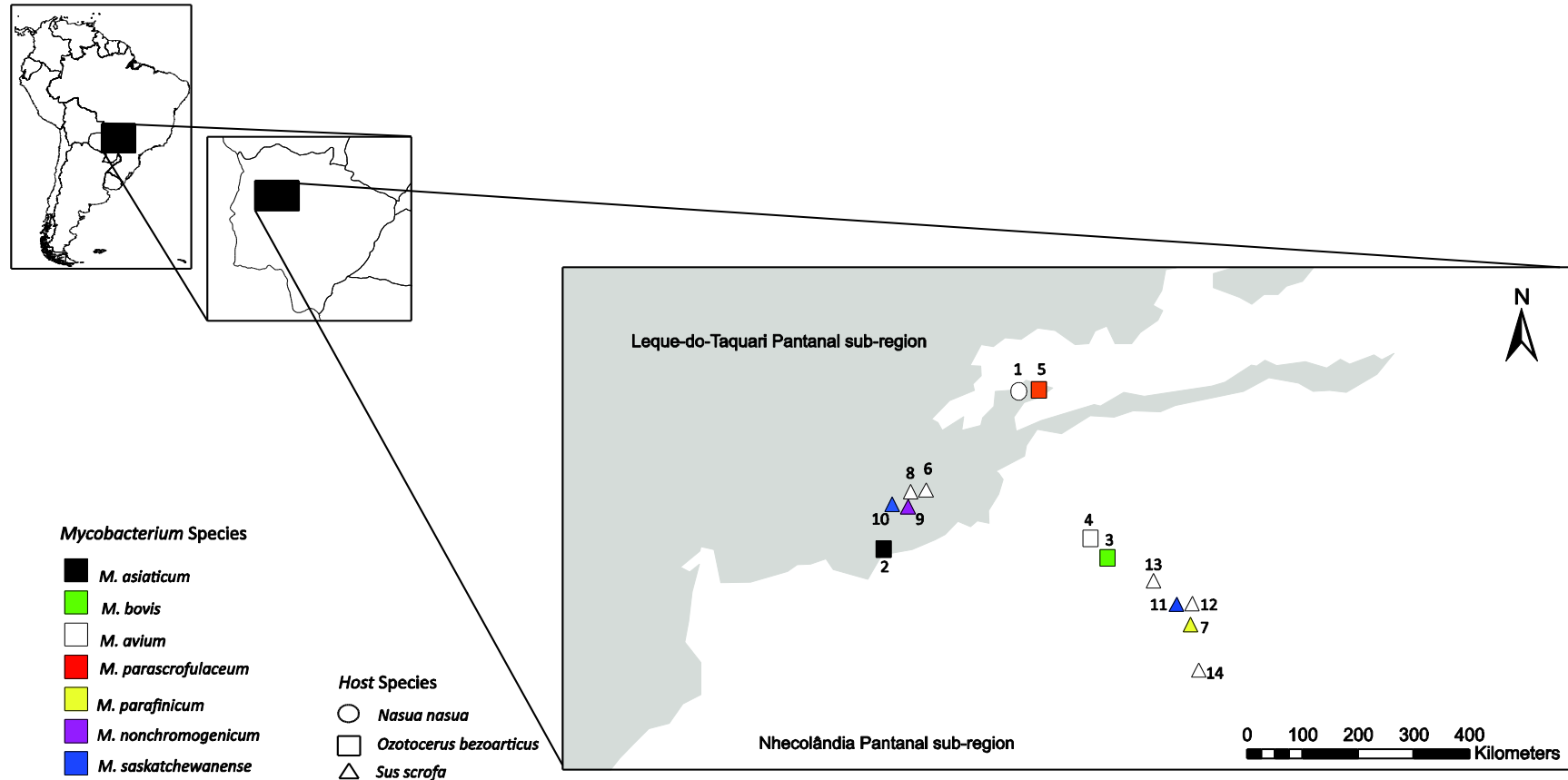


Figura 2 Mapa da região do Pantanal, indicando as áreas de amostragem, as espécies hospedeiras e as espécies de *Mycobacterium* isoladas. As espécies hospedeiras amostradas são indicadas por □ que representam *O. bezoarticus*, △ representando *S. scrofa* e ○ representando *N. nasua*. Os números representam cada indivíduo, 1 - Nn 1; 2-5 - Ob 1, Ob 2, Ob3, Ob 4; 6-14 - Ss 1, Ss 2, Ss3, Ss 4, Ss 5, Ss 6, Ss 7, Ss 8, Ss 9.

APÊNDICE E

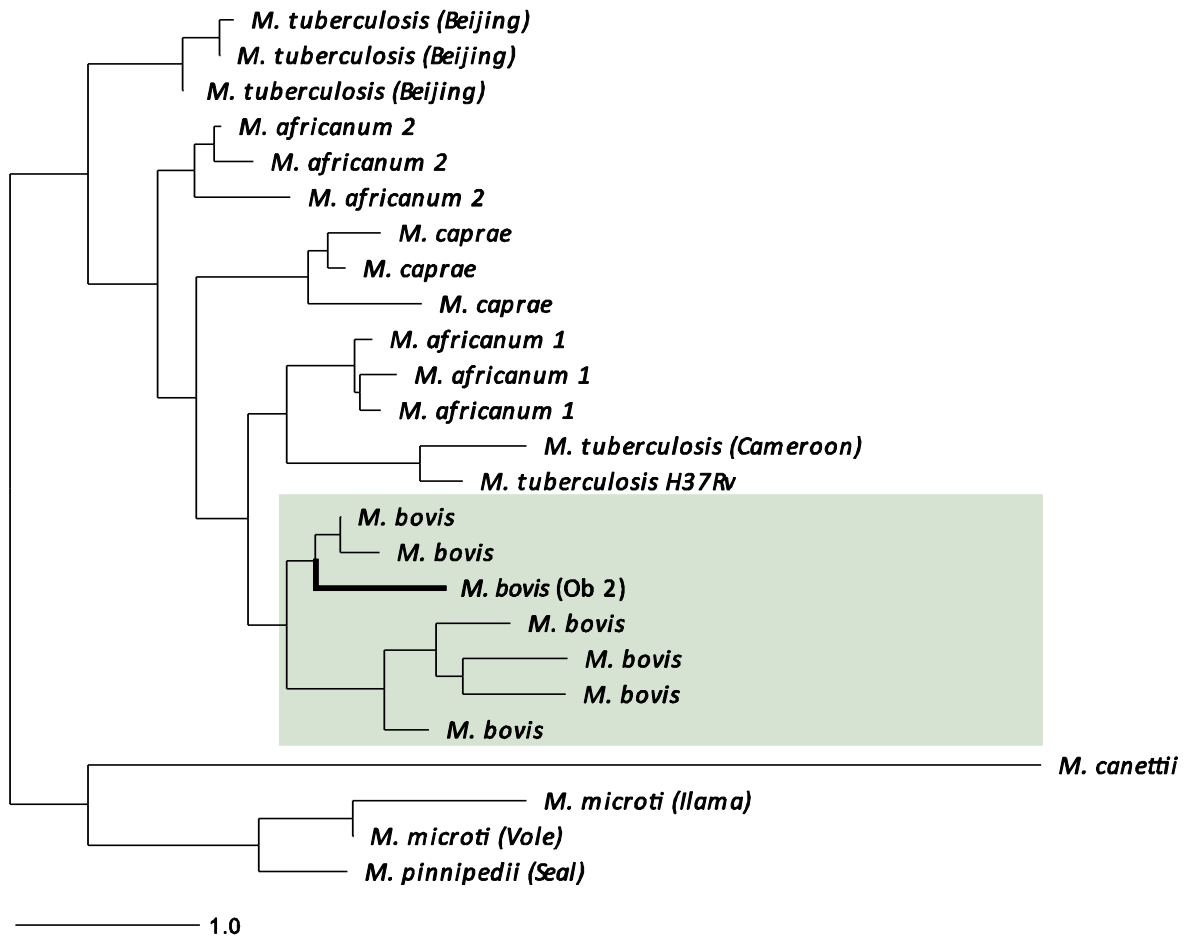


Figura 3 Árvore filogenética criada usando a técnica MIRU-VNTR e a ferramenta web MIRU-VNTR $plus$ (Supply 2005). Uma única amostra de veado campeiro isolada no estudo é indicada por um ramo mais grosso e do sufixo (Ob 2), após o nome da espécie dentro do cluster *M. bovis*, destacado em cinza.

APÊNDICE F

Mycobacteria species in wild mammals of the Pantanal of central South America

Eur J Wildl Res – DOI 10.1007/s10344-014-0866-4