

Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo

Bovine tuberculosis transmission between domestic and feral species in Portugal: first molecular evidences in *Mycobacterium bovis* isolates from a farm in Alentejo

Elsa L. Duarte^{1,2}, Margarida Domingos¹, Teresa Albuquerque¹, Alice Amado¹ e Ana Botelho^{1*}

¹Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Departamento de Bacteriologia, Estrada de Benfica nº 701, 1549-011 Lisboa

²Laboratório de Sanidade Animal/ ICAM, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora codex

Resumo: No âmbito de um estudo mais alargado para a caracterização molecular de estirpes de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e de *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) isoladas em Portugal, tipificaram-se dois isolados de *M. bovis* provenientes de um bovino e de um javali (*Sus scrofa*), que coabitavam na mesma exploração na região do Alentejo. Duas metodologias, reconhecidas pela sua reprodutibilidade e poder discriminatório, foram utilizadas na genotipagem: o "spoligotyping" e a análise de MIRU-VNTR, caracterizando nove *loci* do genoma, que variam no número de repetições nucleotídicas contíguas: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, MIRU-26, QUB 11b, QUB 11a, ETR-C, VNTR 4156 e MIRU-4. Ambos os isolados apresentaram idêntico padrão spoligotyping SB0265, pouco frequente em Portugal mas já descrito em Espanha e em França, e igual número de repetições em cada um dos nove *loci* estudados. Estes dados, aliados à proximidade espacial dos animais, apontam para a probabilidade de transmissão de *M. bovis* entre eles, constituindo as primeiras evidências em Portugal de partilha de estirpes entre espécies silvestres e domésticas. Estes resultados deverão incentivar estudos mais aprofundados sobre o papel das espécies silvestres na epidemiologia da tuberculose bovina em Portugal.

Palavras-chave: Tuberculose bovina, animais silvestres, javali, epidemiologia molecular, spoligotyping, MIRU-VNTR

Summary: Included in a broader study of Portuguese *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) and *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) strains molecular typing, two isolates from a bovine and a wild boar (*Sus scrofa*), that inhabited the same farm in the Alentejo region, were typed. Two techniques were chosen on the basis of their reproducibility and discriminatory power: Spoligotyping and MIRU-VNTR analysis, with characterization of nine different genome *loci* (VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, MIRU-26, QUB 11b, QUB 11a, ETR-C, VNTR 4156 e MIRU-4) that vary in the number of tandem repeats. Isolates shared the same SB0265 spoligotype pattern, an infrequent pattern for

Portuguese isolates but previously described in Spain and France, and presented the same number of repetitions in each of the nine MIRU-VNTR *loci* characterised. This molecular data, along with the spatial closeness of both animals, allowed us to conclude on the probability of *M. bovis* transmission between them, providing the first evidences that, in Portugal, domestic and feral species can share the same strains. These results should encourage further studies on the role of feral species in bovine tuberculosis epidemiology in Portugal.

Keywords: Bovine tuberculosis, feral animals, wild boar, molecular epidemiology, spoligotyping, MIRU-VNTR typing

Abreviaturas: ATCC - American Type Culture Collection; ETR - Exact Tandem Repeat; pb- pares de bases; DR - Direct Repeat; MIRU - Mycobacterial Interspersed Repetitive Units; MTC - Mycobacterium tuberculosis complex; PCR-REA - Polymerase Chain Reaction - Restriction Endonuclease Analysis; QUB - Queen's University of Belfast; SNIRB - Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos; VNTR - Variable Number Tandem Repeats

Introdução

A possibilidade de animais silvestres albergarem estirpes de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) comuns às espécies domésticas, funcionando como potenciais reservatórios responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose, tem sido um tema amplamente debatido em vários países. Em Portugal, sem o apoio de dados moleculares sobre as estirpes isoladas, as informações recolhidas junto das explorações no âmbito dos inquéritos epidemiológicos oficiais apenas fornecem indícios da transmissão entre espécies domésticas e silvestres. Afigura-se, por isso, essencial recorrer a abordagens integradas dos dados da epidemiologia convencional com técnicas de genotipagem para confirmar ou refutar conexões epidemiológicas entre isolados.

*Correspondência: ana.botelho@lniv.min-agricultura.pt

As diferentes espécies bacterianas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), do qual fazem parte *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. canettii*, possuem entre si cerca de 99,9% de homologia genética (Brosch *et al.*, 2000), o que tem dificultado o desenvolvimento de técnicas moleculares específicas de diagnóstico e de tipificação. Presentemente, as técnicas de genotipagem mais comuns recorrem à amplificação por PCR de regiões do genoma suficientemente estáveis para servirem de marcador epidemiológico mas com potencial polimorfismo para diferenciar estirpes sem relação epidemiológica entre si. No caso dos membros do MTC, estas técnicas incluem o spoligotyping (de "spacer", "oligonucleotide" e "typing") e a análise de MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – Variable Number Tandem Repeats).

O spoligotyping, desenvolvido pela primeira vez por Kamerbeek *et al.* (1997), baseia-se na detecção de 43 sequências espaçadoras variáveis de 35 a 41 pb que separam sequências repetidas directas (DR) de 36 pb, existentes na região genómica denominada DR (Direct Repeat). Com base no conhecimento da sequência do genoma de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, Supply *et al.* (2000 e 2001) desenvolveram a tipificação por MIRU-VNTR que se baseia na determinação do número de cópias de sequências nucleotídicas repetidas em tandem, em determinadas regiões do genoma (*loci*) de micobactérias, escolhidas pela sua estabilidade e poder discriminatório. Os VNTR têm sido especialmente úteis na genotipagem de bactérias patogénicas que possuem, à semelhança do MTC, um genoma muito conservado como *Bacillus anthracis* ou *Yersinia pestis* (Lindstedt, 2005).

Utilizados em conjunto, o spoligotyping e a tipificação pelos MIRU-VNTR, por assentarem em regiões independentes do genoma, permitem confirmar ou refutar suspeitas de ligações epidemiológicas entre isolados.

Material e métodos

Inserido num estudo de epidemiologia molecular da tuberculose bovina no nosso país, dois isolados de *M. bovis* provenientes de um bovino – LNIV 386/01/04 - e de um javali (*Sus scrofa*) – LNIV 15176/03- foram tipificados. Os dois animais pertenciam à mesma exploração no Alentejo, perto da fronteira com Espanha. No javali, um animal adulto, foram apenas observadas lesões de necrose nos linfonodos parotídeos, tendo sido estes enviados para análise bacteriológica no LNIV em Novembro de 2003. No bovino, mantido sempre na mesma exploração de acordo com o SNIRB e o único em que se isolou *M. bovis*, foram observadas lesões mais extensas envolvendo o pulmão, linfonodos brônquicos e

mediastínicos, tendo as amostras sido enviadas para o laboratório em Janeiro de 2004.

O isolamento bacteriano foi realizado por sementeira em meios selectivos sólidos e líquidos. A identificação foi efectuada por PCR-REA baseado no gene *gyrB* segundo Niemann *et al.* (2000).

O spoligotyping foi efectuada de acordo com o protocolo descrito por Kamerbeek *et al.* (1997). Resumidamente, a região DR de cada isolado foi amplificada recorrendo a um par de iniciadores, um deles marcado com a biotina. Os produtos de PCR foram desnaturados e hibridados numa membrana onde se encontravam os 43 oligonucleotídeos covalentemente ligados (Figura 1). A presença ou ausência de cada um dos oligonucleotídeos espaçadores foi avaliada recorrendo a um conjugado de estreptavidina-peroxidase (Roche) e visualizado numa película autoradiográfica. Registou-se o perfil de cada isolado, um número binário de 43 dígitos (1 presença, 0 ausência do espaçador), que foi inserido e comparado com os perfis existentes na base de dados internacional <http://www.mbovis.org>.

Para cada isolado procedeu-se ao estudo de nove *loci* MIRU-VNTR: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, MIRU-26, QUB 11b, QUB 11a, ETR-C, VNTR 4156 e MIRU-4. Cada *locus* foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores descritos por Frothingham e Meeker O' Connell (1998), Supply *et al.* (2001), Skuce *et al.* (2002) e van Deutekom *et al.* (2005). O peso molecular dos produtos de PCR foi avaliado por electroforese em gel de agarose Nusieve (Cambrex) a 3%, 5 horas a 120 Volts usando um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Através da análise da base de dados <http://minisatellites.u-psud.fr>, construiu-se uma tabela de interpretação que permitiu definir, para cada *locus*, a relação entre o peso molecular dos produtos de amplificação obtidos e o número de repetições correspondente.

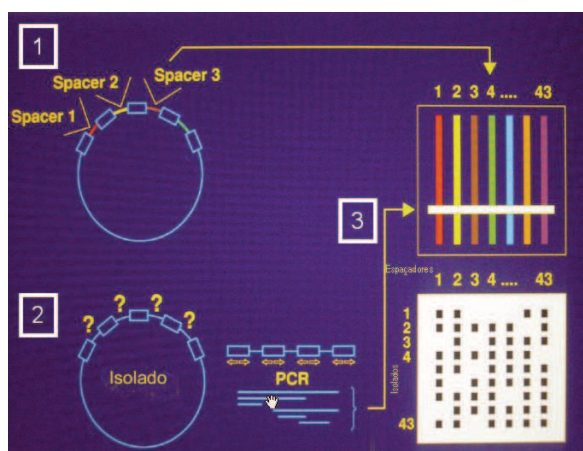


Figura 1 - Passos principais da técnica Spoligotyping: 1 - Cada espaçador ("spacer") da região DR é ligado covalentemente a uma membrana; 2 - As sequências espaçadoras são amplificadas por PCR usando iniciadores complementares das sequências conservadas repetidas directas (DR); 3 - Os produtos de PCR hibridam com os espaçadores na membrana e a presença ou ausência das 43 sequências espaçadoras para cada isolado é avaliada, através de um sinal de quimioluminescência.

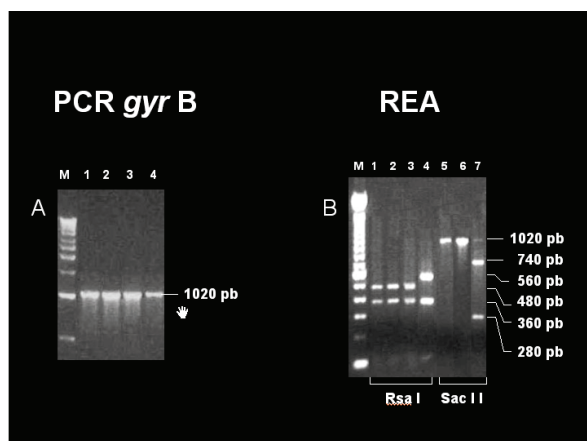


Figura 2 - A - Resultados de amplificação por PCR *gyrB*. - Amplicon de 1020 pb específico do MTC; **M** - marcador de pesos moleculares (Hyperladder III Bioline) **1** - Isolado *M. bovis* LNIV 386/01/04 de bovino; **2** - Isolado *M. bovis* LNIV 15176/03 de javali; **3** - Estirpe de referência *M. bovis* BCG ATCC19015; **4** - Estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25177;

B - Análise de restrição por endonucleases (REA) com os enzimas *Rsa* I e *Sac* II. **M** - marcador de pesos moleculares de 100 pb (Promega) ; **1** e **5** - Isolado *M. bovis* LNIV 386/01/04 de Bovino; **2** e **6** - Isolado *M. bovis* LNIV 15176/03 de Javali; **3** - Estirpe de referência *M. bovis* BCG ATCC 19015; **4** - Estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25177; **7** - Estirpe *M. caprae* LNIV 15244/04

Resultados

Ambos os isolados foram identificados como *Mycobacterium bovis* por PCR-REA (Figura 2).

Os dois isolados apresentaram o mesmo perfil de spoligotyping, registado na base internacional como SB0265, cujas principais características são a ausência das sequências espaçadoras 3, 6, 9, 16, 21 e 39-43 (Figura 3).

Ambos os isolados apresentaram o mesmo número de repetições (Figura 4) para cada um dos nove *loci* MIRU-VNTR caracterizados: QUB11b, duas repetições (205 pb); ETR-A, uma repetição (270 pb); VNTR 3232, seis repetições (517 pb); ETR-C, duas repetições (324 pb); QUB11a, onze repetições (857 pb); ETR-B, quatro repetições (349 pb); MIRU-26, cinco repetições (540 pb); VNTR 4156, uma repetição (622 pb); MIRU-4, três repetições (406 pb).

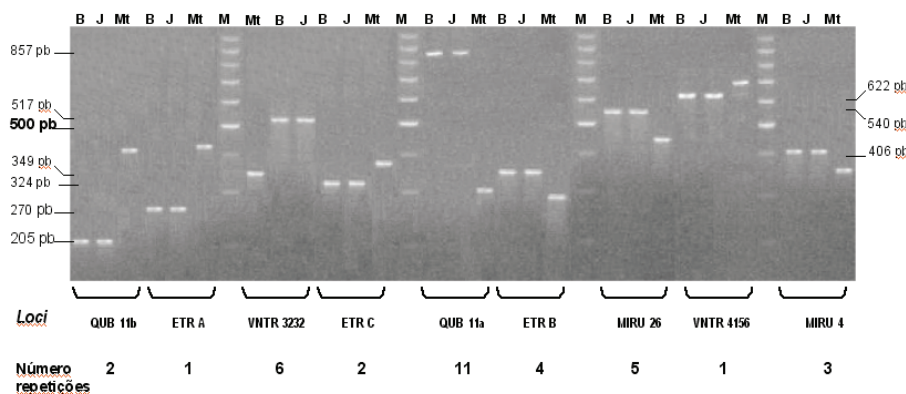


Figura 4 - Resultados da análise MIRU-VNTR para os nove *loci* indicados na figura. O peso molecular de cada locus está indicado lateralmente. **B** - Isolado *M. bovis* LNIV 386/01/04 de bovino; **J** - Isolado *M. bovis* LNIV 15176/03 de javali; **Mt** - Controlo positivo estirpe *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25177; **M** - Marcador de pesos moleculares (Hyperladder IV Bioline)

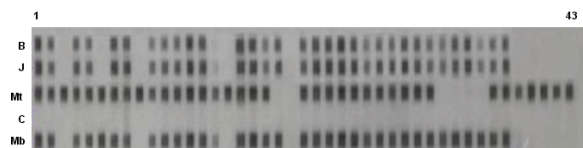


Figura 3 - Resultados do Spoligotyping: Película autorradiográfica dos produtos de PCR hibridados com 43 nucleótidos espaçadores: **B** - Isolado *M. bovis* LNIV 386/01/04 de bovino; **J** - Isolado *M. bovis* LNIV 15176/03 de javali; **Mt** - controlo positivo estirpe *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25177; **C** - Controlo negativo; **Mb** - controlo positivo estirpe *M. bovis* BCG ATCC 19015

Discussão

A utilização de marcadores epidemiológicos independentes e em regiões do genoma não relacionadas, permite obter resultados de maior fiabilidade em epidemiologia molecular, visto aumentar a possibilidade de discriminação entre isolados.

Num estudo anterior, por nós realizado no nosso país, envolvendo a tipificação de 143 estirpes de *M. bovis* e *M. caprae* o índice discriminatório da técnica de spoligotyping foi de 0,9 (Duarte *et al.*, 2008), confirmando a utilidade desta técnica na tipificação dos isolados de *M. bovis*. A capacidade discriminatória de uma técnica ou de um conjunto de técnicas de genotipagem é calculada recorrendo ao índice de Gaston e Hunter (Hunter e Gaston, 1988) que traduz-se matematicamente pela probabilidade de dois isolados, escolhidos ao acaso numa população e sem relação epidemiológica, serem diferenciados pela(s) técnica(s) em questão. O perfil de spoligotyping apresentado pelos dois isolados estudados é pouco frequente em Portugal (2,1 %), de acordo com Duarte *et al.* (2005), o que aumenta a probabilidade destes dois isolados serem a mesma estirpe. Este perfil foi anteriormente identificado em bovinos em Espanha (Aranaz *et al.*, 1996) e em França (Haddad *et al.*, 2001); em javalis está referido em estirpes provenientes da Estremadura Espanhola (Parra *et al.*, 2005), uma região bastante próxima da zona da exploração Alentejana estudada.

Para cada um dos nove *loci* MIRU-VNTR estudados, verificou-se que os dois isolados possuíam exactamente

o mesmo número de repetições. Resultados de outros autores indicam que a associação do spoligotyping e análise por MIRU-VNTR é altamente discriminatória (Skuce *et al.*, 2002; Hilty *et al.*, 2005; Allix *et al.*, 2006).

Recorrendo a vários marcadores epidemiológicos, trabalhos têm sido publicados demonstrando que javalis e bovinos partilham as mesmas estirpes de *M. bovis* quando co-habitam as mesmas regiões de Espanha, Itália ou de vários países da Europa Central (Serraino *et al.*, 1999; Machackova *et al.*, 2003; Aranaz *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2003 e 2005; Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006). No entanto, a importância destes animais na epidemiologia da tuberculose bovina é difícil de avaliar pois prevalências elevadas em populações silvestres poderão não implicar forçosamente um papel importante na transmissão da doença aos bovinos (Corner, 2006). Existem outros parâmetros a serem considerados, entre os quais a densidade populacional dos javalis na área estudada e a sua interacção com as espécies domésticas, nomeadamente a partilha de zonas de pastagem e de abeberamento. Estes animais também podem transpor cercas facilmente e cobrem um território que pode atingir um raio de 50 km na época de caça (Serraino *et al.*, 1999), aumentando a possibilidade de contacto com outras espécies.

Aranaz *et al.* (2004) defendem que os javalis em Espanha são um reservatório da tuberculose bovina, por esta se ter tornado endémica nestes animais em determinadas regiões. Também o aparecimento de surtos em coutadas de caça sem proximidade com explorações bovinas reforçou esta convicção. No entanto, Serraino *et al.* (1999) num estudo realizado no Norte de Itália, defendem que estes animais são hospedeiros de fundo de saco e sem importância na transmissão da doença aos bovinos, por serem animais de actividade nocturna e com pouco contacto com espécies domésticas. Os mesmos autores observaram que as lesões nos javalis, à semelhança do animal que estudámos, se encontravam muitas vezes confinadas aos linfonodos da cabeça, sugerindo a infecção por via digestiva, diminuindo a possibilidade de contagiarem os bovinos directamente por via aerógena. A presença de lesões menos extensas e características nos javalis deverá alertar para a necessidade de uma inspecção rigorosa das carcaças atendendo ao carácter zoonótico do agente.

No presente trabalho, os dados apresentados sugerem a transmissão do agente infeccioso entre os dois animais ou a existência de uma fonte de infecção comum a ambos. No caso da transmissão entre os dois animais, o seu sentido é difícil de apurar visto a tuberculose ter um período de incubação longo, com quadros pouco uniformes e uma evolução arrastada. Em trabalhos futuros, recorrendo a um maior número de isolados e com o apoio de dados de inquéritos epidemiológicos mais pormenorizados, convirá

esclarecer se os javalis no nosso país são hospedeiros de manutenção e reservatórios importantes da doença, ou hospedeiros fundo de saco. Neste último caso, a incidência da doença diminuirá à medida que caminarmos no sentido da erradicação da tuberculose bovina. No entanto, qualquer que seja a relevância das espécies silvestres na epidemiologia da doença, o risco de transmissão ao Homem e animais domésticos existe e será fundamental considerá-lo futuramente na elaboração e implementação de medidas de controlo e erradicação eficazes da tuberculose bovina em Portugal.

Agradecimentos

Agradece-se o apoio técnico prestado por Ilda Lopes (LNIV) na preparação do DNA das amostras e à Dra. Lia Ticló e Dra. Filipa Lourenço da Direcção Geral de Veterinária por terem facultado dados relativos aos movimentos dos animais constantes no SNIRB.

Bibliografia

- Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M (2006). Evaluation of the epidemiological relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 44: 1951-1962.
- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, van Embden JD, Cousins D (1996). Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 34: 2734-2740.
- Aranaz A, de Juan L, Montero N, Sanchez C, Galka M, Delso C, Alvarez J, Romero B, Bezoz J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Dominguez L (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol*, 42: 2602-2608.
- Brosch R, Garnier T, Cole ST (2000). Comparative genomics of the Mycobacteria. *Inter J Med Microbiol*, 290: 143-152.
- Corner LAL (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol*, 112: 303-312.
- van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW, Willery E, Hoijng SP, Locht C, Coutinho RA, van Soolingen D (2005). Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 43: 4473-4479.
- Duarte EL, Domingos M, Amaro A, Amado A, Botelho A (2005). Molecular typing of Portuguese *Mycobacterium bovis* by Spoligotyping (Abstract). The Fourth

- International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dublin, Ireland, 22nd-26th August.
- Duarte EL, Domingos M, Amado A e Botelho A (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 130: 415-421.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol*, 144: 1189-1196.
- Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B (2001). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol*, 39: 3623-3632.
- Hermoso de Mendoza J, Parra A, Tato A, Alonso JM, Rey JM, Pena J, Garcia-Sanchez A, Larrasa J, Teixido J, Manzano G (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev Vet Med*, 74: 239-247.
- Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J (2005). Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol*, 109: 217-222.
- Hunter PR, Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26: 2465-2466.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35: 907-914.
- Lindstedt BA (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26: 2567-2582.
- Machackova M, Matlova L, Lamka J, Smolik J, Melicharek I, Hanzlikova M, Docekal J, Cvetnik Z, Nagy G, Lipiec M, Ocepek M, Pavlik I (2003). Wild Boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet Med Czech*, 48: 51-65.
- Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E (2000). Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, 38: 3231-3234.
- Parra A, Fernandez-Llario P, Tato A, Larrasa J, Garcia A, Alonso JM, Hermoso de Mendoza M, Hermoso de Mendoza J (2003). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol*, 97: 123-133.
- Parra A, Larrasa J, Garcia A, Alonso JM, Mendoza JH (2005). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol*, 110: 293-300.
- Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MC, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, Dini W, Mignone W, Franzetti F, Gori A (1999). Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol*, 37: 2766-2771.
- Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SMM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiol*, 148: 519-528.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiol*, 36: 762-771.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C (2001). Automated High-Throughput Genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*, 39: 3563-3571.

