

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Aplicação da técnica de MLVA para tipificação molecular de
Mycoplasma bovis isolados, em Portugal, de doenças
respiratórias bovinas**

Vitor Emanuel Lopes Pereira

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Versão Provisória

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Botelho
Prof. Doutora Mónica Cunha

2017



**Aplicação da técnica de MLVA para tipificação molecular de
Mycoplasma bovis isolados, em Portugal, de doenças
respiratórias bovinas**

Vitor Emanuel Lopes Pereira

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.) sob a orientação directa da Doutora Ana Botelho, com orientação interna da Professora Doutora Mónica Cunha no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

"Mother Nature is a serial killer. No one's better. Or more creative. Like all serial killers, she can't help the urge to want to get caught. What good are all those brilliant crimes if no one takes the credit? So, she leaves crumbs. Now the hard part, why you spend a decade in school, is seeing the crumbs. But the clue's there. Sometimes the thing you thought was the most brutal aspect of the virus, turns out to be the chink in its armor. And she loves disguising her weaknesses as strengths."

Dr. Andrew Fassbach in World War Z, 2013

Agradecimentos

Não foram dois anos fáceis, principalmente em termos emocionais, mas muitas pessoas contribuíram de alguma forma para que esta etapa da minha vida finalmente se tenha cumprido.

O meu primeiro agradecimento é dirigido à minha orientadora externa, Doutora Ana Botelho, por me ter aberto as portas do seu laboratório e por me ter dado este grande desafio que foram os micoplasmas. Agradeço-lhe também toda a transmissão da sua sabedoria, cooperação e sugestões, tal como da revisão da dissertação.

Expresso também a minha gratidão à Professora Doutora Mónica Cunha, a minha orientadora interna, que se mostrou sempre disponível, e também pela revisão da dissertação.

À Doutora Engenheira Ana Cristina Ferreira, por toda a disponibilidade, ajuda teórica e prática que demonstrou com a técnica de MLVA.

Este trabalho não seria concluído sem a grande ajuda da Applied Maths NV a quem agradeço pela cedência de uma chave para a utilização do software Bionumeris.

À Doutora Tresa Albuquerque pela cedência das amostras biológicas de bovinos e também pela ajuda com algumas das informações necessárias para o estudo.

À Dra. Ana Canto e à Dra. Maria José Barahona, pela celeridade com que prestaram auxílio.

À Dona Conceição pela ajuda fundamental com os meios de cultura, sem os quais não teria avançado na dissertação.

Às técnicas, técnicos e estagiárias do laboratório de vários departamentos do INIAV, I.P., que tive a oportunidade de conhecer. Vocês são muitos, mas nunca me esquecerei de vocês nem dos momentos passados, fizeram-me sentir como se fosse da casa. Obrigado pelo acolhimento, apoio, carinho e pelos conselhos que me deram.

À Professora Doutora Lélia Chambel e à Professora Doutora Ana Reis, a quem agradeço a oportunidade que me deram para ingressar no mestrado e por me terem dado a conhecer melhor o que é a microbiologia.

Aos meus pais pelos sacrifícios e pelo apoio nas decisões que tenho tomado na vida, tanto em termos académicos como desportivos.

À Alexandrina Loureiro por me ter ajudado a pôr-me em condições, talvez a pessoa que mais contribuiu para que não tivesse desistido do meu objectivo. Obrigado por tudo.

Ao meu “núcleo duro”, os meus grandes amigos de berço, André Esperança, Bruno Santos, Carlos Amareleja, Ricardo Ferreira e Telmo Gomes, pelo companheirismo e obviamente também por tudo.

A todos um grande obrigado!

Resumo

Mycoplasma bovis é um agente patogénico capaz de causar mastite, pneumonia, artrite e otite em bovinos. Uma das doenças mais graves é a BRDC (*Bovine respiratory disease complex*). Apesar da BRDC poder ser causada por vários agentes patogénicos, apenas para *M. bovis* não existe antibioterapia e vacinação eficazes.

Com o objectivo de avaliar o contributo de *M. bovis* no desenvolvimento de doenças respiratórias em Portugal, foram sujeitas a análise 303 amostras *post mortem* colhidas em 2015 de bovinos com suspeitas de tuberculose bovina. Foram obtidos nove isolados de micoplasmas, pertencentes a diversas regiões, que foram caracterizados com recurso a testes bioquímicos e PCR, tendo sido identificados como pertencentes a estirpes de *M. bovis*.

As frequências relativas calculadas mostraram que existem essencialmente dois focos a nível regional, nomeadamente para a região Norte (6,7 %) e para a região de Lisboa e Vale do Tejo (14,3 %). A nível de país para o ano de 2015 a frequência relativa foi de 3 %. Apenas dois casos de co-infecção com *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium bovis* foram verificados (0,7 %), ambos pertencentes à região Norte.

De modo a evidenciar a possível relação epidemiológica de isolados de *M. bovis*, foi desenvolvida e adaptada a técnica de MLVA com base num painel de 12 *loci*. Para além dos nove isolados obtidos, foram também utilizados 58 isolados de *M. bovis* (67 no total) de 1997-2017 pertencentes ao biobanco do INIAV I.P., obtidos de surtos de PPCB (1993-1998) e de outros bovinos com suspeitas de pneumonia, mastite ou tuberculose bovina. Foi também incluído um isolado da Hungria e um da Nigéria.

Após a standardização do método MLVA, foram apenas considerados 11 *loci*, pois o *locus* MbovTR49-51 mostrou, consistentemente, um padrão de multibanda. Foram encontrados neste estudo 14 novos alelos, nunca antes observados, para sete dos *loci*, dos quais oito são considerados como intermédios.

A análise da diversidade HGDI, mostrou uma variedade a nível de *locus* de 3 a 7 polimorfismos, tendo o HGDI variado entre 0,337 e 0,777. Em termos de poder discriminatório da técnica para o painel de 11 *loci* foram obtidos 55 perfis MLVA para um HGDI de 0,989, sendo o perfil predominante o perfil 00201044324 (MbovTR14-MbovTR29-MbovTR30-MbovTR31-MbovTR35-MbovTR40-41-MbovTR52-MbovTR59-MbovTR147-MbovTR148-MbovTR427), encontrado em cinco estirpes. Estes valores de diversidade mostram que a técnica de MLVA pode ser utilizada em isolados de *M. bovis* com um objectivo de diferenciação.

Para um limite de corte a 55 %, o dendrograma mostrou a formação de seis *clusters*, dos quais quatro pertencem a estirpes portuguesas e os outros dois a estirpes, respectivamente, dos EUA e da Nigéria, indicando que parecem existir diferenças entre estirpes a nível continental, com estirpes da Europa, África e América do Norte pertencendo a *clusters* diferentes. A análise por árvore de extensão mínima (MST) mostra que existem dentro das

estirpes analisadas nove complexos clonais. Estes resultados sugerem uma origem múltipla e uma grande diversidade dentro das estirpes portuguesas. Não foram demonstradas relações temporais nem regionais dentro dos isolados analisados a nível de país, algo que poderá estar relacionado com o tipo de gestão praticado nas explorações portuguesas, que poderá estar a favorecer a disseminação de *M. bovis* em Portugal.

As estirpes deste estudo foram também comparadas com estirpes de outros estudos para um painel de 8 *loci*. A MST mostrou a presença de onze complexos clonais em estirpes europeias, onde igualmente é verificada uma origem múltipla a nível de país para Portugal e Hungria, mas também existe uma linhagem comum entre estirpes europeias, onde são incluídas algumas estirpes portuguesas. Estes resultados sugerem que a facilidade de transacção de bovinos dentro da comunidade europeia possa estar implicada na disseminação de *M. bovis* nos últimos 20 anos na Europa.

Palavras-chave: *Mycoplasma bovis*, BRDC, MLVA, Epidemiologia molecular, Bovinos

Abstract

Mycoplasma bovis is a pathogen capable of causing mastitis, pneumonia, arthritis and otitis in cattle. One of the most serious diseases is BRDC (Bovine respiratory disease complex). Although BRDC can be caused by several pathogens, only for *M. bovis* there is no effective antibiotic therapy and vaccination.

In order to evaluate the contribution of *M. bovis* in the development of respiratory diseases in Portugal, 303 *post mortem* samples collected in 2015 from bovine animals with suspected bovine tuberculosis were analyzed. Nine mycoplasma isolates were obtained from several regions, and were characterized by biochemical tests and PCR, and identified as belonging to *M. bovis* strains.

The relative frequencies calculated showed that there are essentially two foci at regional level, namely for the Northern region (6.7 %) and for the Lisboa e Vale do Tejo region (14.3 %). At country level for the year 2015 the relative frequency was 3 %. Only two cases of co-infection (0.7 %) with *Mycoplasma bovis* and *Mycobacterium bovis* were found, both belonging to the Northern region.

In order to show the possible epidemiological relationship of *M. bovis* isolates, the MLVA technique was developed and adapted based on a panel of 12 *loci*. In addition to the nine isolates obtained, 58 *M. bovis* isolates from 1997-2017 (making 67 isolates in total) belonging to the INIAV I.P., biobank, isolated from PPCB outbreaks (1993-1998) and from other cattle with suspected pneumonia, mastitis or bovine tuberculosis, were included in the analysis. An isolate from Hungary and one from Nigeria were also included.

After standardization of the MLVA method, only 11 *loci* were selected, since the MbovTR49-51 locus consistently showed a multiband pattern. In this study 14 new alleles, never observed before, were found for seven of the *loci*, of which eight are considered as intermediates repeats.

Analysis of the HGDI diversity showed a *locus*-wide variety of 3 to 7 polymorphisms, with HGDI varying between 0.337 and 0.777. In terms of discriminatory power of the technique, for the 11 *loci* panel, 55 MLVA profiles were obtained corresponding to a HGDI of 0.989, with the predominant profile being the profile 00201044324 (MbovTR14-MbovTR29-MbovTR30-MbovTR31-MbovTR35-MbovTR40-41-MbovTR52-MbovTR59-MbovTR147-MbovTR148-MbovTR427) found in five strains. These diversity values show that the MLVA technique can be used in *M. bovis* isolates for the purpose of differentiation.

For a cut-off value of 55 %, the dendrogram showed the formation of six clusters, four of which belong to Portuguese strains and the other two to strains, respectively, from the USA and from Nigeria, indicating that seem to exist differences between strains at continental level, with European, African and North American strains belonging to distinct *clusters*. The analysis by minimum extension tree (MST) shows that there are nine clonal complexes within the analyzed strains. These results suggest a multiple origin and a great diversity within *M. bovis* Portuguese

strains. No temporal or regional relationships have been found within isolates, which may be related to the type of management practiced in Portuguese farms, which may favor the dissemination of *M. bovis*.

The strains of this study were also compared with strains from other studies using a panel of 8 *loci*. MST showed the presence of eleven clonal complexes in European strains, where a multiple country origin is also verified for Portugal and Hungary, but there is also a common lineage between European strains, where some Portuguese strains are included. These results suggest that the ease of transaction of cattle within the European community may be implicated in the spread of *M. bovis* in the last 20 years in Europe.

Keywords: *Mycoplasma bovis*, BRDC, MLVA, Molecular epidemiology, Cattle

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	XII
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Género <i>Mycoplasma</i>.....	1
1.1.1. Características gerais do género <i>Mycoplasma</i>	1
1.1.2. Taxonomia do género <i>Mycoplasma</i>	2
1.1.3. Filogenia do género <i>Mycoplasma</i>	3
1.2 <i>Mycoplasma bovis</i>	4
1.2.1 Taxonomia e filogenia de <i>Mycoplasma bovis</i>	4
1.2.2 Características de <i>Mycoplasma bovis</i>	4
1.2.3 Hospedeiros e Patogenia de <i>Mycoplasma bovis</i>	5
1.2.4 O papel de <i>Mycoplasma bovis</i> no complexo de doenças respiratórias bovinas (BRDC)	6
1.3 Diagnóstico laboratorial de infecção causada por <i>Mycoplasma bovis</i>	8
1.3.1 Método ELISA	8
1.3.2 Isolamento cultural e testes bioquímicos	9
1.3.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	10
1.4 Epidemiologia molecular	10
1.4.1 Tipificação molecular.....	11
1.4.3 Método MLVA.....	12
1.5. Objectivos	14
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Isolados bacterianos e amostras biológicas	15
2.2 Condições de cultura e isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i>.....	15
2.3 Identificação de espécies de micoplasmas.....	15
2.3.1 Testes bioquímicos – Identificação fenotípica.....	15
2.3.2 Polimerase chain reaction – Identificação genotípica	16

2.3.2.1	Extracção de DNA.....	16
2.3.2.2	Quantificação por nanodrop.....	17
2.3.2.3	Mistura de reacção e condições de amplificação	17
2.3.2.4	Electroforese e visualização do DNA	17
2.4	Cálculo da frequência de isolamentos de <i>Mycoplasma bovis</i> e de co-infecção com <i>Mycobacterium bovis</i>.....	17
2.5	<i>Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)</i>	18
2.5.1	Análise <i>in silico</i>	18
2.5.2	Cálculo do número de repetições em cada <i>locus</i>	18
2.5.3	Mistura de reacção, condições de PCR, electroforese e visualização dos produtos de amplificação.	19
2.5.4	Codificação dos perfis MLVA e análise de dados – Dendrogramas e árvores de extensão mínima	20
2.5.5	Índice de diversidade dos <i>loci</i> e poder discriminatório da técnica MLVA.....	20
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS.....		21
3.1	Isolamento e identificação de <i>Mycoplasma bovis</i> em amostras com suspeita de tuberculose bovina.....	21
3.2	Frequências de isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i> e co-infecção com <i>Mycobacterium bovis</i>, por região geográfica.....	22
3.3	Análise <i>in silico</i> do genoma da estirpe tipo de <i>Mycoplasma bovis</i> (PG45^T).	24
3.4	Tipificação dos isolados de <i>Mycoplasma bovis</i> por MLVA.....	25
3.5	Estandardização dos perfis alélicos.....	29
3.6	Índice de diversidade de Hunter e Gaston	31
3.7	Análise de agrupamento das estirpes de <i>Mycoplasma bovis</i> deste estudo	31
3.8	Análise da relação de estirpes de <i>Mycoplasma bovis</i> por árvores de extensão mínima (MST)	33
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO		36
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....		46
BIBLIOGRAFIA.....		48
ANEXOS.....		52
Anexo A1 – Identificação bioquímica de micoplasmas		52
Anexo A2 – Sequências dos 12 <i>loci</i> em PG45 ^T		53

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – Taxonomia clássica da classe <i>Mollicutes</i>	2
Figura 1.2 – Posição filogenética dos membros da classe <i>Mollicutes</i>	3
Figura 1.3 – Lesões macroscópicas de BRDC e esquema de pulmões de bovino.....	7

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

Figura 3.1 – Distribuição geográfica das amostras analisadas..	23
Figura 3.2 – Relações de semelhanças genéticas das 68 estirpes de <i>Mycoplasma bovis</i> , incluindo a estirpe tipo PG45 ^T , baseado em MLVA	32
Figura 3.3 – Árvore de extensão mínima com base na análise de 11 <i>loci</i> para 65 estirpes de <i>Mycoplasma bovis</i> portuguesas	34
Figura 3.4 – Árvore de extensão mínima descrevendo as relações de 128 estirpes de <i>Mycoplasma bovis</i> de vários países europeus, incluindo a estirpe tipo PG45 ^T , com base em 8 <i>loci</i>	35

Índice de Tabelas

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens de técnicas de tipificação.	11
--	----

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2.1 – Sequências de <i>primers</i> , gene alvo e tamanho de produto de amplificação.	16
Tabela 2.2 – Sequência dos <i>primers</i> para amplificação dos 12 <i>loci</i> utilizados na análise MLVA e respectivas temperaturas de hibridação	19

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

Tabela 3.1 – Identificação bioquímica e molecular dos isolados de <i>Mycoplasma spp.</i>	21
Tabela 3.2 – Frequências relativas de isolamentos de <i>Mycoplasma bovis</i> por região geográfica	22
Tabela 3.3 – Co-infecção com <i>Mycoplasma bovis</i> e <i>Mycobacterium bovis</i>	22
Tabela 3.4 – Características dos 12 <i>loci</i> utilizados para a análise MLVA em <i>Mycoplasma bovis</i> com base na estirpe de referência PG45 ^T	24
Tabela 3.5 – Tipificação por MLVA dos isolados de <i>Mycoplasma bovis</i> analisados	25
Tabela 3.6 – Codificação de alelos para os 11 <i>loci</i> VNTR analisados.	29
Tabela 3.7 – Perfis MLVA obtidos com base em 11 <i>loci</i> nos isolados de <i>Mycoplasma bovis</i>	30
Tabela 3.8 – Poder discriminatório da técnica MLVA e dos <i>loci</i> utilizados.....	31

ANEXOS

Tabela A1 - Características bioquímicas para a identificação de micoplasmas de bovinos e de pequenos ruminantes	52
---	----

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*
ALT – Alentejo
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATP – Adenosina trifosfato
BL – Beira Litoral
bp = pb – Pares de base
BRDC – *Bovine respiratory disease complex*
C – Centro
CC – Complexo clonal
CO₂ – Dióxido de carbono
DAV – Direcção de alimentação e veterinária
DGAV – Direcção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleótido fosfatado
DSAVR – Direcção de serviços de alimentação e veterinária regional
EDM – Entre Douro e Minho
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
HGDI – *Hunter Gaston Discriminatory Index*
IC – Intervalo de confiança
ICNP – *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*
IDC – Prova da intradermotuberculinização de comparação
IJSEM – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*
INIAV, I. P. – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*
LVT – Lisboa e Vale do Tejo
MbovTR – *Mycoplasma bovis tandem repeat*
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MLST – *Multilocus sequence typing*
MLVA – *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*
MST – *Minimum Spanning Tree*
N – Norte
NaOH – Hidróxido de sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NCTC – *National Collection of Type Cultures*
ORF – *Open reading frames*
p. ex. – Por exemplo
PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – *Polymerase chain reaction*
PES – Polioxietileno sorbitano
PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis*
PPCB – Peripneumonia Contagiosa Bovina
RAPD – *Random Amplification of Polymorphic DNA*
rRNA – Ácido ribonucleico ribosomal
SNR – *Single nucleotide repeat*
TB – Tuberculose bovina
TR – *Tandem repeat*
TRF – *Tandem Repeats Finder*
tRNA – Ácido ribonucleico de transferência
UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
VNTR – *Variable number tandem repeat*

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Género *Mycoplasma*

1.1.1. Características gerais do género *Mycoplasma*

O termo “micoplasma” pensa-se ter sido inicialmente utilizado por Albert Bernhard Frank em 1889 para designar um protoplasma infectado por fungo em nódulos de plantas leguminosas ⁽¹⁾. A utilização do termo “micoplasma” foi aplicado durante muitos anos de forma trivial a todos os elementos da classe *Mollicutes*, pois os microorganismos desta classe possuem todos uma membrana celular desprovida de parede celular. No entanto, hoje em dia, é mais correcto o uso do termo “mollicutes” para os elementos da classe, sendo que o termo “micoplasma” deve ser usado de forma mais restrita, isto é, deve ser empregue relativamente às espécies do género *Mycoplasma*. O nome *Mollicutes* é derivado de um adjectivo latino, *mollis* = macio, maleável, e de um nome latino feminino, *cutis* = pele, indicando que os elementos da classe possuem um limite celular flexível ou maleável. Relativamente ao nome *Mycoplasma*, a derivação vem dos nomes gregos *myces* = fungo, e *plasma* = algo formado ou moldado (uma forma) ⁽²⁾. As bactérias da classe *Mollicutes* são das mais pequenas bactérias conhecidas e o diâmetro das células pode variar entre 300-800nm. Os géneros definidos dentro da classe *Mollicutes* são *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma*. Também se inclui um género de espécies não cultiváveis, o género “*Candidatus Phytoplasma*” (Figura 1.1) ⁽³⁾.

As espécies do género *Mycoplasma* têm essencialmente cinco características gerais: requerimento de colesterol ou outros esteróis semelhantes para o crescimento, temperatura de crescimento óptima a 37°C, incapacidade de realizar a hidrólise de ureia, um genoma de dimensão entre 580 a 1350kb e são comensais ou patogénicos de hospedeiros vertebrados ^(3,4).

Existem características relevantes das espécies do género *Mycoplasma* que derivam da ausência de parede celular. Uma delas é o pleomorfismo das células que podem ser esféricas, ovóides, em forma de bastonete ou em forma de garrafa, podendo formar colónias filamentosas, sendo os filamentos finos e ramificados com um comprimento entre 50 a 500 nm. A capacidade de crescer em meio sólido abaixo da superfície, coloração como gram-negativa, resistência a lise por lisozima, susceptibilidade a lise por choque osmótico e outros agentes capazes de causar lise em protoplastos bacterianos, filtrabilidade por filtros de poro 450 nm ou até mesmo 220 nm e 100 nm em alguns casos, são também características relacionadas com a ausência de parede celular. Outra característica resultante da ausência de parede celular é a resistência a β -lactâmicos, polimixinas, vancomicina, fosfomicina, sulfonamidas e trimetoprima. As colónias típicas apresentam protuberância central com a aparência de “ovo estrelado”, podendo também ter aparência semelhante a couve-flor ou de aspecto liso, com margens lisas, irregulares ou onduladas.

Os micoplasmas são aeróbios ou anaeróbios facultativos, havendo também espécies que crescem bem em condições de anaerobiose (*Mycoplasma leopharyngis* e *Mycoplasma spermatophilum* p. ex.). São geralmente não móveis havendo algumas exceções em que a mobilidade é feita por deslizamento (*Mycoplasma mobile* e *Mycoplasma testudineum* p. ex.). Quanto à sua nutrição, apresentam-se como quimiorganotróficos, utilizando como fonte de carbono açúcares ou arginina. Em espécies patogénicas os factores de virulência estão relacionados com a formação de biofilmes, mobilidade e invasão intracelular facultativa. Algumas espécies possuem ainda antigénios de superfície variáveis (Vsp) que são responsáveis pela evasão ao sistema imunitário dos hospedeiros. No género *Mycoplasma* o conteúdo de G+C varia entre 23-40% e o codão UGA codifica para triptofano e não para codão STOP ⁽²⁾.

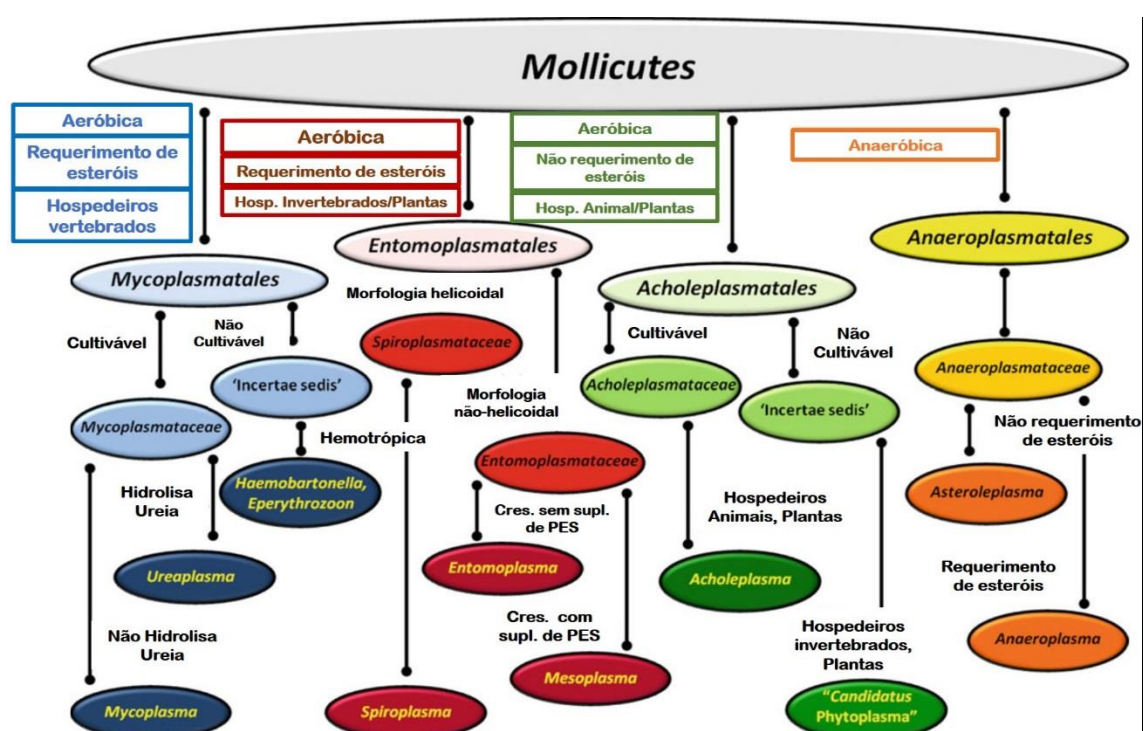


Figura 1.1 – Taxonomia clássica da classe Mollicutes. As quatro ordens são agrupadas por características diferenciadoras nas respectivas famílias e géneros. As espécies "*Candidatus Phytoplasma*" não podem ser cultivadas em cultura axénica, e como tal o requisito para esteróis não pode ser avaliado actualmente. PES, Polioxietileno sorbitano, utilizado na ausência de soro no meio de cultura. (adaptado de Balish & Blanchard, 2014 ⁽⁴⁾).

1.1.2. Taxonomia do género *Mycoplasma*

O género *Mycoplasma* pertence à família *Mycoplasmataceae*, ordem *Mycoplasmatales*, classe *Mollicutes*, filo *Tenericutes*, domínio *Bacteria* ⁽³⁾.

O género *Mycoplasma* é composto por 117 espécies e 4 subespécies com estatuto válido, 9 espécies *Candidatus*, 1 espécie *incertae sedis* e 4 espécies com estatuto inválido, de acordo com o *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* ⁽³⁾.

Por outro lado, em *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) que lista todas as espécies validamente publicadas no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), de acordo com as regras do *International Code of*

Nomenclature of Prokaryotes (ICNP), o número de espécies reconhecidas é de 125 espécies, 4 subespécies e 1 *incertae sedis* ⁽⁵⁾.

Os critérios de atribuição para a classe *Mollicutes* são a ausência de parede celular, a capacidade de passar em filtros de poro 450-220 nm e a presença de sequências genéticas características e conservadas do gene que codifica para o rRNA16S. No caso do gênero *Mycoplasma*, o crescimento na presença de oxigênio exclui a atribuição aos gêneros *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma*. O requerimento de esteróis exclui os gêneros *Acholeplasma* e “*Candidatus Phytoplasma*”. A morfologia não-helicoidal e a associação a hospedeiros vertebrados eliminam a possibilidade de pertencer aos gêneros *Spiroplasma*, *Entomoplasma* e *Mesoplasma* e a incapacidade de hidrolisar ureia impede a atribuição ao gênero *Ureaplasma* (Figura 1.1) ⁽²⁾.

A identificação de espécies dentro do gênero *Mycoplasma* é feita com base em testes bioquímicos, serológicos e morfologia da cultura, tal como a análise da sequência do gene rRNA 16S ⁽⁶⁾.

1.1.3. Filogenia do gênero *Mycoplasma*

Por análise comparativa do gene do rRNA 16S foi obtida a relação filogenética de bactérias pertencentes à classe *Mollicutes* com bactérias pertencentes a um subgrupo específico definido por bactérias do filo *Firmicutes*, isto é, bactérias de baixo teor G+C. Nomeadamente as bactérias *Clostridium ramosum* e *Clostridium innocuum*, que se encontram mais afastadas de outros membros do gênero *Clostridium*. Na base da filogenia dos mollicutes estão bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (Figura 1.2) ^(7,8). A classe *Mollicutes*, com exceção dos elementos pertencentes ao gênero *Asteroleplasma*, representam um grupo monofilético que se pensa ter divergido há cerca de 605 milhões de anos ^(8,9).

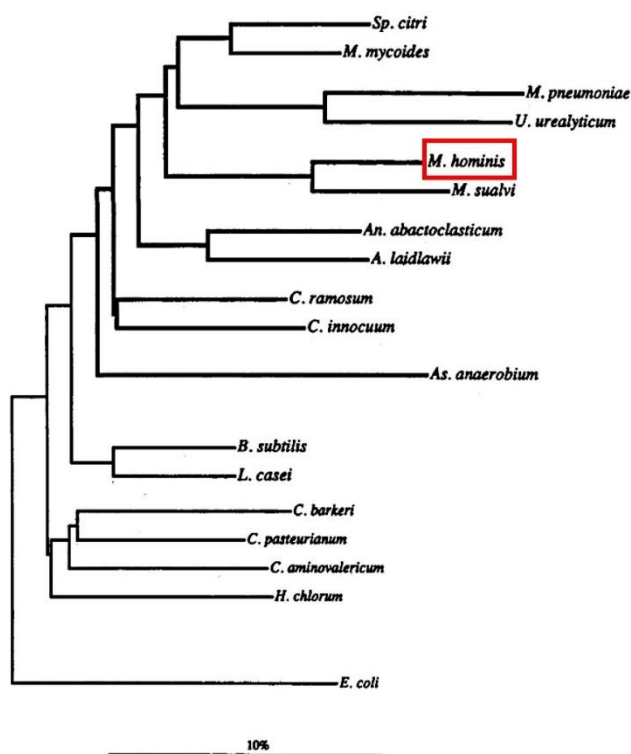


Figura 1.2 – Posição filogenética dos membros da classe *Mollicutes*. São mostrados 6 clades que representam os grupos *pneumoniae* e *hominis* (ambos de espécies de micoplasmas), *spiroplasma* (onde se encontra o ramo de *Mycoplasma mycoides*), *anaeroplasma*, *asteoleplasma* e grupos mais próximos. A barra a 10% indica a distância evolutiva. (Adaptado de Weisburg et al., 1989 ⁽⁹⁾)

A classe *Mollicutes* surge por evolução degenerativa de formas bacterianas mais complexas do ponto de vista bioquímico, morfológico e genético, uma vez que os micoplasmas não possuem parede celular, perderam capacidade metabólica e sofreram redução ao nível do

genoma. Estes eventos de redução ao longo da evolução poderão ter acontecido várias vezes ao longo do tempo ⁽⁷⁾.

As espécies do género *Mycoplasma* podem ainda ser agrupadas em dois grandes grupos, cada um com vários ramos de acordo com as assinaturas de sequência genéticas. Assim, o grupo *hominis* possui os ramos filogenéticos *equigenitalium*, *bovis*, *lipophilum*, *synovia*, *hominis*, *pulmonis*, *sualvi* e *neurolyticum*. O grupo *pneumoniae* contém os ramos filogenéticos *fastidiosum*, *pneumoniae*, *ureaplasma*, *muris* e um ramo de micoplasmas Hemotrópicos. No caso do grupo *spiroplasma* são encontrados mais alguns micoplasmas, estando também representado o ramo *Mycoplasma mycoides*. A presença de micoplasmas no grupo *spiroplasma* mostra que o género *Mycoplasma* não é um grupo monofilético (Figura 1.2) ^(8,9).

1.2 *Mycoplasma bovis*

1.2.1 Taxonomia e filogenia de *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis foi isolado inicialmente em 1961 a partir de um surto de mastite bovina de uma exploração leiteira no estado do Connecticut dos Estados Unidos ⁽¹⁰⁾. A estirpe tipo é denominada *Donetta*, PG45, ATCC 25523 ou NCTC 10131 ⁽¹¹⁾. Anteriormente, *M. bovis* tinha a designação de *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* devido a características culturais e serológicas semelhantes nas espécies *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma bovis*. A elevação a espécie ocorreu em 1976, devido a comparação de genomas das duas espécies por hibridação DNA-DNA onde foi obtido o valor de 40 % de homologia. No entanto, filogeneticamente por análise do gene rRNA 16S, as espécies *M. agalactiae* e *M. bovis* apresentam uma semelhança de 99,8 %, estando as duas no ramo *bovis* do grupo *hominis* ^(9,12).

1.2.2 Características de *Mycoplasma bovis*

As células de *Mycoplasma bovis* são cocóides ou por vezes filamentosas. São formadoras de biofilmes, responsáveis pela persistência no ambiente e no hospedeiro, resistências a antibióticos e cronicidade das doenças causadas, pois são impermeáveis aos antibióticos e à acção dos macrófagos ^(13,14).

As colónias em meio sólido apresentam a morfologia de “ovo-estrelado” com centros manifestamente grandes, e produzem “*film and spots*”, indicando a presença de actividade lipolítica. A temperatura óptima de crescimento é de 37 °C, podendo ser utilizada uma atmosfera de 5 % de CO₂ e agitação. Esta espécie é capaz de oxidar piruvato ou lactato para a produção de energia sob a forma de ATP, mas não é capaz de fermentar glucose nem de hidrolisar arginina ⁽²⁾.

Até à data existem três genomas de *M. bovis* sequenciados e publicados: a estirpe tipo PG45^T, Hubei-1 e HB0801 ^(15–17). Existem ainda outras estirpes com genoma sequenciado, de submissões directas, na base de dados do *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI), CQ-W70, NM 2012 e 08M. Há ainda genomas sequenciados de HB0801-P115, HB0801-P150 e HB0801-P180 que são formas atenuadas de passagens sucessivas de HB0801, que estão disponíveis com a finalidade de se estudar a patogénese causada por *M. bovis*. Com excepção da estirpe tipo PG45^T, que tem origem nos Estados Unidos, todas as outras estirpes são oriundas da China ^(15–18). As estirpes chinesas, particularmente, apresentam uma inversão de 580 kb no genoma, que se pensa que tenha derivado de elementos móveis ^(16,17).

Relativamente às características gerais, o cromossoma circular da estirpe tipo apresenta uma dimensão de 1 003 404 pb, mas apenas 89,5 % do genoma é codificante. A dimensão do genoma das outras estirpes é variável entre 948 121 pb (Hubei-1) a 1 016 753 pb (08M). A percentagem de G+C sensivelmente de 29,3 % é comum a todas as estirpes, tal como a presença de 34 genes de tRNA ^(16,18). Os codões que codificam para arginina são os menos representados no genoma, o que indica a baixa eficiência da utilização de tRNA^{arg} ⁽¹⁷⁾.

Verifica-se que no genoma de *M. bovis* o número de *open reading frames* (ORFs) varia entre 813 (Hubei-1 e CQ-W70) a 870 (PG45^T) e a variação dos pseudogenes é de 32 (CQ-W70) a 98 (HB0801-P180). Em *M. bovis* existe um número reduzido de genes de rRNA (5S, 23S e 16S), geralmente dois, que se reflecte no comportamento fastidioso deste microrganismo, isto é, reduzida capacidade de síntese proteica. Como o microrganismo é fastidioso, usam-se correntemente meios de cultura complexos ⁽¹⁸⁾.

Entre as estirpes PG45^T e Hubei-1, 662 genes são identificados como genes ortólogos, que constituem o genoma *core*, enquanto que, o genoma específico é constituído por 46 genes na estirpe PG45^T e 51 genes na estirpe Hubei-1 ⁽¹⁷⁾. Até à data não são conhecidos plasmídeos nesta espécie de micoplasma ⁽¹⁹⁾.

1.2.3 Hospedeiros e Patogenia de *Mycoplasma bovis*

Os bovinos, nomeadamente da espécie *Bos taurus* são o reservatório natural de *Mycoplasma bovis*, que está associado a uma grande diversidade de doenças: mastite, arterite, otite média, meningite, distúrbios genitais (nomeadamente metrite, aborto, vesiculite seminal e infertilidade), queratoconjuntivite infecciosa bovina, tenossinovite, abscessos decubitais e ao complexo de doenças respiratórias bovinas (BRDC do inglês *Bovine respiratory disease complex*), mais precisamente pneumonia e broncopneumonia ^(20–22).

Apesar de alguns micoplasmas serem específicos de um único hospedeiro, no caso de *M. bovis* parece haver uma gama mais alargada de hospedeiros. Para além de bovinos já foram relatados isolamentos em animais como cabras, porcos, bisontes-americanos, algumas aves e Homem ⁽²³⁾. No entanto, quando causa doença, a morbilidade e mortalidade são, presumidamente, mais baixas do que no gado bovino, com excepção dos bisontes-americanos em que a morbilidade e a mortalidade são elevadas ⁽²⁴⁾. Deve então ser dada especial atenção a estes presuntivos hospedeiros, pois podem funcionar como vectores de transmissão de *M. bovis* ⁽²²⁾.

M. bovis tem importância a nível económico, visto que as várias patologias levam a perdas de produção, principalmente na indústria leiteira e indústria de carnes, com redução da produção do leite, redução do ganho de peso diário dos animais e morte. A eliminação de *M. bovis* é muito difícil quando se estabelece na população hospedeira ^(21,22).

A transmissão pode ocorrer de modo vertical ou horizontal. A transmissão vertical ocorre, quando com uma vaca infectada com *M. bovis* passa o agente para o feto ou por via mamária através do colostro e do leite contaminados ⁽²⁵⁾.

A transmissão horizontal ocorre por via directa ou indirecta de um animal portador para outros animais. O agente patogénico pode ser transmitido, por via directa, através de contacto entre narizes, aerossóis, tracto genital ou sémen, e por via indirecta através de comida, água, ambientes contaminados ou fómites ^(21,26). No caso dos vitelos, *M. bovis* pode permanecer num estado inactivo no tracto respiratório, ou causar infecção sem manifestações clínicas ou lesões detectáveis ^(22,27). O vitelo, nesta situação, funciona como um vector de transmissão de *M. bovis* que poderá causar possíveis infecções a gerações futuras ⁽²²⁾. O movimento entre explorações de animais portadores assintomáticos é, portanto, um importante meio de disseminação de *M. bovis* ^(22,27).

1.2.4 O papel de *Mycoplasma bovis* no complexo de doenças respiratórias bovinas (BRDC)

Em vitelos e gado jovem a arterite e a broncopneumonia são as doenças mais prevalentes, enquanto em adultos as doenças com maior prevalência são as mastites e as pneumonias ^(25,28). As patologias mais graves associadas a *Mycoplasma bovis* estão relacionadas com doenças respiratórias, dado que são as que causam mais mortes nos bovinos, resultado da ineficácia da aplicação de tratamentos com antibióticos, que conduzem a doenças crónicas ou morte ⁽²⁹⁾.

A BRDC é uma doença multifactorial que envolve factores físicos e fisiológicos, que quando combinados resultam na predisposição do gado bovino para contrair doenças respiratórias agudas. A gravidade da BRDC é maior em gado de explorações intensivas, o que pode levar a perdas económicas bastante elevadas, devido às altas taxas de morbilidade e mortalidade, aos custos associados a tratamentos e ao baixo rendimento obtido com a carcaça ^(13,20,30).

Antes da chegada a uma exploração infectada a prevalência da BRDC em vitelos é baixa 0-7 %. A prevalência aumenta para 40-100 %, de acordo com a maioria dos estudos, após duas semanas de permanência na exploração, parecendo existir uma relação com os factores de stress. O transporte, o desmame e a mistura do gado em regime intensivo são os principais factores de stress. Estes três factores são sinérgicos na medida em que enfraquecem o sistema imunitário dos hospedeiros, promovendo o desenvolvimento da BRDC. Outros factores de stress são a exposição aos agentes patogénicos, as condições ambientais, as mudanças nutricionais e as más práticas de manejo dos animais ^(29,30).

Os agentes etiológicos que estão envolvidos na BRDC são vírus e bactérias. Os vírus mais comuns conhecidos são o BoHV-1 (*bovine herpes virus 1*), BVDV-1 (*bovine viral diarrhoea virus 1*), BRSV (*bovine respiratory syncytial virus*) e BPIV-3 (*bovine parainfluenza virus 3*). As bactérias isoladas mais comuns associadas à BRDC são *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Trueperella pyogenes* e *Mycoplasma bovis* ^(25,29). A mera presença de *M. bovis* não é indicativa de uma infecção pulmonar, já que existem animais portadores que não desenvolvem pneumonia ou broncopneumonia. Ainda não está bem esclarecido se *M. bovis* é um agente patogénico capaz de causar uma infecção primária, ou se é um agente patogénico secundário que invade um pulmão já comprometido. O assunto é controverso visto que, *M. bovis* é mais frequentemente isolado em conjunto com outros intervenientes na BRDC. De facto, a suspeita de infecção por *M. bovis* resulta de estados crónicos de pneumonia e claudicação, quando a antibioterapia contra os outros agentes patogénicos não resulta numa melhoria da saúde do animal ⁽²⁹⁾.

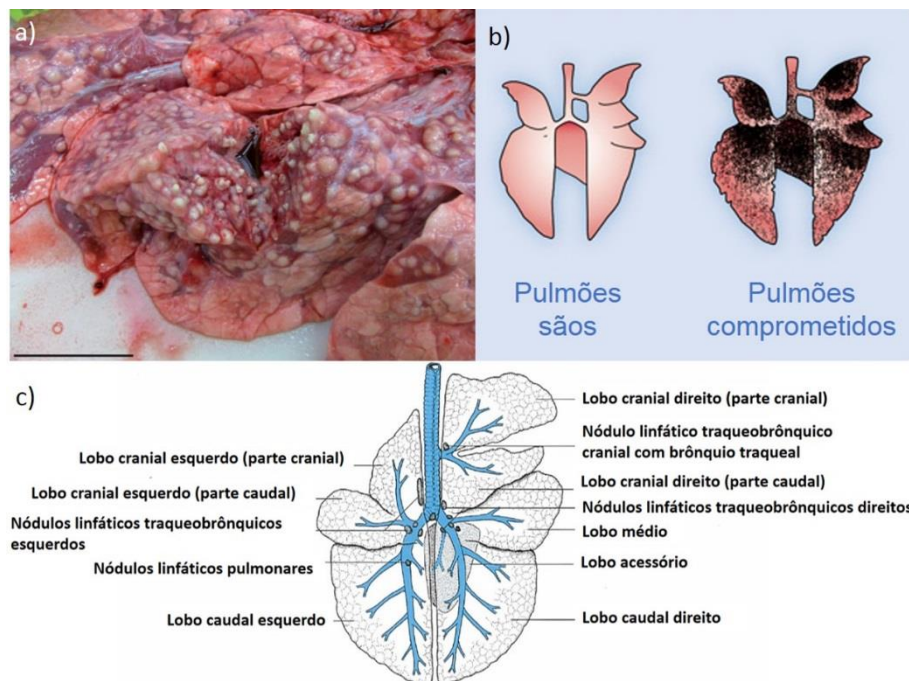


Figura 1.3 – Lesões macroscópicas de BRDC e esquema de pulmões de bovino. a) Pulmão de bovino exibindo focos de lesões necróticas caseosas causadas por *Mycoplasma bovis*. barra = 5 cm. b) Progressão da lesão nos pulmões. c) Esquema dorsal dos pulmões de bovino. (a) adaptado de Nicholas, R. A. J., 2011 ⁽¹³⁾, b) adaptado de *Lung Protection Therapy*, 2017 ⁽³¹⁾ c) adaptado de König, H. E et al., 2014 ⁽³²⁾.

A patologia respiratória causada por *M. bovis* envolve a consolidação pulmonar dos lobos craniais e médios com lesões crónicas de broncopneumonia caseonecrótica. As lesões são na maioria dos casos bilaterais. Em casos mais graves 80 % dos pulmões são afectados, ficando apenas finas porções dos lobos caudais livres de infecção. As lesões crónicas de broncopneumonia caseonecrótica são muitas vezes confundidas com as lesões causadas por *Mycobacterium bovis*, agente da tuberculose bovina, na zona da superfície do tecido pulmonar. Contudo, a lesão causada por *Mycoplasma bovis* apresenta focos múltiplos secos e quebradiços de necrose caseosa dentro dos lobos pulmonares afectados (Figura 1.3) ^(13,29). *M. bovis* é também isolado a partir de outras lesões como, broncopneumonia com focos de

necrose de coagulação, broncopneumonia superativa sem necrose e broncopneumonia crónica com abscesso, mas nestes casos são também isolados outros microrganismos ^(27,29).

O primeiro isolamento de *M. bovis* em Portugal ocorreu em 1987, de um vitelo com meningite. As lesões pulmonares provocadas por *M. bovis* podem ser por vezes semelhantes às provocadas por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, o agente da PPCB (Peripneumonia Contagiosa Bovina). Porém, a PPCB já se encontra erradicada na Europa desde 1999, estando apenas presente na África subsariana, sendo Portugal considerado indemne de PPCB desde 2003 ⁽³³⁾.

Apesar de não existir nenhum sintoma típico que possa ser directamente associado a *M. bovis*, o estado de doença crónica em que um animal se encontra e os animais portadores que podem funcionar como vectores de transmissão são factores que justificam a análise laboratorial de modo a serem promovidas medidas de controlo ^(29,34).

1.3 Diagnóstico laboratorial de infecção causada por *Mycoplasma bovis*

O diagnóstico em laboratório pode ser feito com amostras *ante mortem* ou *post mortem*. No caso de *ante mortem* as amostras mais comuns são zaragatoa nasal, zaragatoa nasofaríngea, lavagem broncoalveolar e lavagem transtraqueal. As amostras *post mortem* são na sua maioria de tecidos pulmonares e gânglios, mas podem também ser analisadas amostras de fígado, baço, mama, peritонеu, rim, pleura e diafragma, conforme é pedido pelo médico veterinário da exploração ou entidade veterinária oficial competente (Direcção Geral de Alimentação e Veterinária - DGAV) ⁽³⁵⁾.

O diagnóstico de micoplasmas em rotina tem como técnica “*Gold standard*” o isolamento cultural ⁽⁶⁾. A detecção de anticorpos no sangue e a identificação molecular podem similarmente ser feitas por método serológico ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) e pelo método PCR (do inglês *polymerase chain reaction*). Os métodos são aplicados consoante o objectivo pretendido e o tipo de amostra ⁽³⁶⁾.

1.3.1 Método ELISA

O método ELISA apesar de rápido, sensível e específico, necessitar de pouca manipulação e de ter aplicação num grande número de amostras, pode apenas ser utilizado em cenários de suspeita de infecção, isto é, quando o microrganismo se torna invasivo. A detecção de anticorpo (*Sandwich* ELISA) é aplicada em soros de sangue e leite, e só pode ser feita aos 10-14 dias depois da infecção, ou seja, o microrganismo por este método não pode ser detectado durante o período de incubação, mas só apenas quando os primeiros sinais clínicos surgem. Tem ainda a desvantagem de só poder ser feita a partir do soro de sangue. Por outro lado, o método indirecto por ELISA, ou captura de antigénio, tem a problemática de poder haver reacção cruzada com antigénios de *Mycoplasma agalactiae*, o que quer dizer que neste caso dificulta a identificação de *Mycoplasma bovis*, mas tem a vantagem de poder ser aplicado em outras amostras biológicas que não soro. Comparativamente com métodos culturais, o método ELISA não é afectado por tratamentos com antibiótico. Assim sendo, o

método ELISA tem maior utilidade para a triagem de animais suspeitos de mastite, ao nível da exploração, para importações e exportações ^(13,36,37).

1.3.2 Isolamento cultural e testes bioquímicos

Relativamente ao isolamento por método cultural, existem diversos meios de cultura para a detecção e isolamento de micoplasmas ⁽³⁸⁾. A maior desvantagem do método cultural é o facto de os micoplasmas serem microrganismos fastidiosos, podendo em condições desfavoráveis levar a tempos de incubação de 10 dias. Outra desvantagem é a obtenção de resultados falsos-negativos devido a possibilidade de contaminação bacteriana e prévia aplicação de antibióticos nos animais. Isto torna a resposta morosa e dificulta a implementação de medidas de controlo e de erradicação das doenças. As vantagens do método cultural estão relacionadas com a alta especificidade e sensibilidade, mas também com a possibilidade de detecção de vários micoplasmas, incluindo novas espécies, numa única amostra ^(13,29,36).

O teste de sensibilidade à digitonina permite avaliar a necessidade de colesterol para o crescimento, característica dos géneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma* ⁽³⁹⁾. Este teste é realizado com a colocação de um disco embebido em digitonina no centro da placa. A digitonina é uma molécula classificada como saponina esteróide e possui um efeito de detergente. A molécula é capaz de interagir com moléculas de colesterol e outras moléculas de 3 β -hidroxiesteróides formando complexos de precipitação digitonina-colesterol, que são insolúveis em água. Os complexos de digitonina-colesterol causam o aumento da permeabilidade membranar, devido a rearranjos na bicamada lipídica, levando à perda de potencial de membrana e consequentemente à lise celular dos micoplasmas ^(39,40). Da mesma forma, em meio sólido é possível observar a produção de “*Film and Spot*”, que é uma característica bioquímica de alguns micoplasmas. A observação por microscopia revela em estados precoces do crescimento, um depósito cristalino. Em estados tardios o filme, que tem natureza lipídica, é visível por exame macroscópico. No caso dos *spots*, estes resultam da deposição de sais de cálcio e de magnésio oriundos da actividade lipolítica ⁽⁴¹⁾.

A importância do isolamento bacteriano deve-se ao facto de se obter o microorganismo viável possibilitando a caracterização fenotípica e genotípica do isolado. A identificação de micoplasmas necessita de confirmação por testes bioquímicos e por PCR ⁽⁶⁾.

Em relação aos testes bioquímicos, é necessário obter uma cultura pura em fase logarítmica de crescimento (geralmente 2 a 4 dias de incubação). Os testes bioquímicos realizados são: fermentação da glucose, hidrólise da arginina, redução do tetrazólio, actividade fosfatásica e produção de “*Film and Spots*”. Consoante o perfil obtido nestes testes, e após consulta de uma tabela com as características fenotípicas de cada espécie (Anexo A1), é feita a identificação da espécie. No caso das espécies *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma agalactiae* o perfil fenotípico é idêntico e como tal, a identificação apenas pode ser confirmada com um método molecular, geralmente PCR, por ser um método rápido, sensível e específico ^(6,36).

1.3.3 Polymerase Chain Reaction - PCR

Em termos de diagnóstico, comparativamente com o método cultural, o PCR não detecta a viabilidade do microrganismo, mas apenas a presença de ácidos nucleicos. No entanto, uma vez que *Mycoplasma bovis* é um agente patogénico fastidioso, a importância da detecção desta bactéria por PCR directamente nas amostras biológicas, permite a actuação rápida, controlando animais em estado subclínico ou crónico das doenças, dado que a emissão de resultado pode ser dada no prazo de um dia. Por PCR é também possível a confirmação da identificação de um isolado como *M. bovis* ^(36,42).

Um dos PCRs convencionais de *M. bovis* tem como alvo o gene rRNA 16S que difere apenas em oito posições nucleotídicas de *Mycoplasma agalactiae*, sendo o desenho dos *primers* baseado nestas diferenças. O isolamento de *M. agalactiae* em bovinos é raro e, por este motivo, o sistema Mbo-PCR implementado pode ser aplicado ao diagnóstico de *M. bovis* (Tabela 2.1) ⁽⁴²⁾.

O *primer* MboF está desenhado para emparelhar na região V2 do gene rRNA16S, que é igual nas duas espécies, e o *primer* MboR está desenhado para emparelhar na região V6 que possui as duas diferenças nucleotídicas. Para os casos em que se suspeita de *M. agalactiae*, é realizado um outro PCR em que os *primers* estão desenhados para emparelharem nas regiões V6 e Sb5 do gene rRNA 16S, sendo o produto de amplificação de 734 pb (Tabela 2.1) ^(42,43).

Devido à sua grande sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, rapidez na obtenção de resultados e capacidade de análise de muitas amostras em simultâneo, comparativamente com o isolamento cultural, o PCR tem tido um papel fundamental no diagnóstico laboratorial de *M. bovis*. Qualquer amostra biológica pode ser analisada por PCR, no entanto devem ser tidos cuidados especiais na preparação da amostra para minimizar a presença de inibidores, que são característicos de cada tipo de amostra, na reacção de PCR. Deve também ser garantida uma correcta extracção do DNA, de modo a serem evitados resultados falsos-negativos ou falsos-positivos. Geralmente a aerossolização e fontes contaminadas de reacções anteriores como, superfícies, pipetas, luvas e reagentes são as maiores origens de reacções falsas positivas. Devem então ser garantidas condições de assepsia e boas práticas laboratoriais. Os cuidados mais relevantes são a separação de divisões de preparação de mix de PCR e adição de DNA na mistura de reacção e a inclusão de controlos na reacção PCR, nomeadamente controlos positivo e negativo, para que os resultados obtidos sejam considerados como válidos ⁽⁴⁴⁾.

1.4 Epidemiologia molecular

A epidemiologia é o estudo da distribuição e determinantes de doenças em populações específicas e na aplicação do referido estudo para prevenir e controlar essas doenças. No caso da epidemiologia molecular, esta é um ramo da epidemiologia que utiliza como ferramentas métodos da biologia molecular, para definir a distribuição de uma doença numa população. No entanto, a identificação dos determinantes etiológicos depende de uma abordagem epidemiológica analítica, ou seja, conhecer detalhadamente quais as relações entre agente(s)

etiológico(s), ambiente e hospedeiro. O poder combinado da abordagem epidemiológica analítica com métodos de biologia molecular, tem possibilitado a obtenção de informação importante acerca das infecções causadas por agentes patogénicos ⁽⁴⁵⁾.

1.4.1 Tipificação molecular

A tipificação molecular é utilizada com o propósito de estudar a disseminação e dinâmica populacional de microrganismos em ambientes clínicos e ambientais, em níveis que variam de um simples hospedeiro a um ecossistema global. Os estudos realizados podem ser relativos a sistemas de vigilância de doenças infecciosas, investigação de surtos, estudo da patogénese e percurso da infecção e estudo da genética populacional bacteriana ⁽⁴⁶⁾. A tipificação de estirpes bacterianas possibilita a rápida localização de fontes de infecção, padrões e vias de transmissão, possível associação de uma estirpe com sinais clínicos e patogenicidade, especificidade relativa a um órgão ou tecido infectado e estado da infecção (nova infecção, reinfeção ou infecção persistente ou crónica) ⁽⁴⁷⁾. Desta forma, a identificação de um conjunto de casos epidemiológicos e geneticamente relacionados num surto, são suficientes para a intervenção e implementação de medidas de prevenção e de controlo. Na tipificação molecular, ou genotipagem, são gerados padrões únicos ao nível de estirpe, que por análise podem ser comparados e relacionados epidemiologicamente. Assim, estirpes que têm genótipos iguais ou altamente semelhantes e que estão ligadas por dados epidemiológicos, provavelmente estão relacionadas com o mesmo surto ^(48,49).

A análise de polimorfismos pode ser feita determinando uma variação nucleotídica, analisando as regiões repetitivas do genoma ou examinando a dimensão dos vários fragmentos do genoma, com recurso a técnicas de tipificação molecular ⁽⁴⁹⁾. Em *Mycoplasma bovis* já foram aplicadas, com objectivo de diferenciação, as técnicas de tipificação molecular PFGE (do inglês *Pulsed-field gel electrophoresis*), RAPD (do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*), MLST (do inglês *Multilocus sequence typing*), MLVA (do inglês *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) ⁽³⁷⁾. Todas estas técnicas apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 1.1) ⁽⁴⁷⁾.

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens de técnicas de tipificação.

Método	Vantagens	Desvantagens
PFGE	Altamente discriminatório.	Demorado, trabalhoso, requer equipamento específico.
	Permite ter a noção da dimensão do genoma	Moderadamente robusto Facilidade de desempenho moderado
RAPD	Rápido, simples e barato	Hibridação não específica de <i>primers</i> Baixo poder discriminatório Baixa reprodutibilidade
	Altamente discriminatório. Sensível e reprodutível. Permite a revelação de relações evolutivas.	Demorado e caro. Requer equipamento próprio.
AFLP		

(Tabela 1.1 continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
MLST	Permite a revelação de relações evolutivas.	Moderadamente discriminatório Muito cara e demorada. Baixo rendimento por análise
MLVA	Altamente discriminatório. Simples, rápido e barato. Grande portabilidade. Pode ser realizado em electroforese em gel de agarose ou electroforese capilar.	A alta variabilidade pode causar instabilidade de alguns loci.

Adaptado de Hyytiä-Trees et al., 2007 e Sachse et al., 2005 ^(47,50)

A escolha do método de tipificação deve ter em conta critérios de desempenho e de conveniência. Os critérios de desempenho são: estabilidade dos marcadores utilizados, poder discriminatório, concordância epidemiológica, reprodutibilidade e população teste adequada ao estudo. Os critérios de conveniência são: flexibilidade, tempo de resposta, acessibilidade, facilidade de uso, custos, adequação para análise computadorizada e armazenamento de resultados ⁽⁴⁶⁾.

1.4.3 Método MLVA

O método MLVA comparativamente com PFGE, um método considerado como "*Gold standard*" em muitas espécies bacterianas, tem vantagens relativamente à reprodutibilidade, comparação de resultados inter-laboratoriais e rendimento por análise. Comparativamente com o método MLST, um método que tem vindo a ser escolha preferencial em estudos epidemiológicos, apresenta a vantagem de ser mais rápido e de fácil execução⁽⁵⁰⁾. Para além das características já referidas, como factores considerados para a escolha do método MLVA estão também o poder discriminatório acima de 0,90, valor considerado como minimamente desejável na maioria dos estudos realizados em *Mycoplasma bovis*, um baixo custo, facilidade de execução e facilidade de análise. Estas características tornam o método apropriado para uma rotina de tipificação ^(51–56).

No entanto, o método não permite o estabelecimento de relações filogenéticas, uma vez que os estudos evolutivos são normalmente baseados em áreas conservadas do genoma, ao contrário dos estudos epidemiológicos que são focados normalmente em zonas do genoma que evoluem com maior rapidez. Outras vantagens do método MLVA são a possibilidade de genotipagem de bactérias com genomas grandes apenas com um número limitado de *loci* e a rápida verificação da identidade de estirpes mantidas em colecção, principalmente de agentes patogénicos e estirpes de interesse ^(46,57,58).

A técnica de MLVA tem por base a análise por PCR, de sequências repetidas em tandem em determinados *loci* com o objectivo de obter um perfil para uma dada estirpe e posterior comparação de vários perfis de modo a agrupar as estirpes num dendrograma ⁽⁵⁸⁾.

As repetições em tandem quando usadas para tipificação têm como característica chave a dimensão do polimorfismo. Os *Variable number tandem repeats* (VNTRs) são classificados em microssatélite (2-9 pb), minissatélite (maior que 9 pb) ou *single nucleotide repeat* (SNR – 1 pb) ⁽⁵⁸⁾. As sequências repetidas em tandem são originadas a partir de erros na replicação do

DNA, mais precisamente devido ao deslizamento da DNA polimerase, que provoca ganho ou perda de uma ou mais unidades de repetição. Outro evento, associado ao deslize da DNA polimerase, que pode levar ao surgimento de repetições em tandem é a reparação de quebras de DNA na dupla cadeia.

Os alelos originados são resultado de uma deleção ou inserção (*indel*) de uma ou mais unidades de repetição. As unidades de repetição podem ser completas ou incompletas, neste último caso a repetição obtida é intermédia de uma repetição completa, resultando num alelo anormal. A anormalidade destas repetições está ligada a deleções na sequência flanqueadora e a unidades de repetição intermédias ^(57–59).

Os *loci* utilizados em MLVA são variáveis em termos de taxas de mutação, deste modo há *loci* que são monomórficos (pouco variáveis) e *loci* que são polimórficos (muito variáveis), sendo estes últimos mais informativos, pois permitem uma maior discriminação entre isolados. Uma vez que o comportamento num *locus* não pode ser previsto, deve ser feita a experimentação com um grande número de estirpes de modo a saber se o *locus* é monomórfico ou polimórfico ⁽⁵⁷⁾.

Relativamente aos marcadores polimórficos, que resultam de uma maior taxa de eventos de mutação, são muito instáveis e terão um maior valor de homoplasia, principalmente no que diz respeito aos microssatélites. Considera-se homoplasia quando linhagens com diferente história evolutiva e sem ancestral comum, apresentam um mesmo carácter, neste caso o mesmo número de repetições num dado *locus* VNTR. Deste modo, análises baseadas apenas em marcadores altamente polimórficos provavelmente não agrupam estirpes por relação de proximidade histórica, mas sim por semelhança de homoplasia. Por outro lado, a variabilidade das homoplasias na técnica de MLVA, ou seja, para o estudo de relações epidemiológicas e, portanto, de eventos relacionados com a extensão da transmissão recente, é compensada com a análise múltipla dos vários *loci*. Isto acontece porque o espaço genético considerado na análise é maior com um maior número de *loci* do que com um menor número de *loci*. Quando o espaço genético dos possíveis perfis é grande, uma alta taxa de mutação dispersa os genótipos em todo este espaço para que cada *cluster* tenha menos isolados, e *clusters* são menos propensos a serem compostos por isolados de diferentes ancestrais ^(57,58,60).

1.5. Objectivos

Durante a última década tem-se verificado na Europa que a infecção por micoplasmas, principalmente *Mycoplasma bovis*, é a principal causa de doenças respiratórias bovinas (BRDC). Em Portugal micoplasmoses bovinas devidas a *M. bovis* têm sido esporadicamente detectadas em casos de mastite e de pneumonia, mas a verdadeira relevância deste agente patogénico para a produção bovina é desconhecida. Quando a Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) entrou na fase de baixa incidência até à erradicação, notou-se um aumento de isolamentos de *M. bovis* em casos de pneumonias, mas não foram feitos estudos neste âmbito. Desde 2003, em que Portugal foi oficialmente declarado livre de PPCB, poucos diagnósticos bacteriológicos e serológicos de micoplasmoses pulmonares bovinas têm sido feitos, desconhecendo-se qual o papel de *M. bovis* como agente etiológico principal ou secundário de doenças respiratórias bovinas.

Assim, com este trabalho pretende-se:

1. Avaliar o contributo de *Mycoplasma bovis* no desenvolvimento de doenças respiratórias em bovinos, nomeadamente em casos de suspeita de tuberculose bovina.
2. Estandardizar o método MLVA para a tipificação de isolados de *Mycoplasma bovis*.
3. Avaliar a diversidade genética por MLVA de estirpes de *Mycoplasma bovis*, pertencentes à colecção de culturas do INIAV, isoladas de 1997 a 2017 em Portugal.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Isolados bacterianos e amostras biológicas

Foram utilizados neste estudo um total de 67 isolados (Tabela 3.5): 58 isolados de *Mycoplasma bovis*, pertencentes à colecção de culturas do INIAV (56 Portuguesas, um isolado da Hungria e um isolado da Nigéria) e 9 isolados obtidos neste trabalho de amostras biológicas recolhidas em Portugal. Os isolados, compreendendo os anos de 1997 a 2017, foram obtidos de bovinos com suspeita de pneumonia, mastite ou tuberculose bovina e de surtos de PPCB (1993-1998). As estirpes tipo de *Mycoplasma bovis*, PG45^T e de *Mycoplasma agalactiae*, PG2^T foram usadas como referência.

Para o isolamento de *M. bovis*, foram analisadas 303 amostras de macerados de pulmão, gânglio, fígado, baço, mama, peritoneu, rim, pleura e diafragma de bovinos com suspeita de tuberculose bovina, recolhidas em 2015 em Portugal Continental e nos Açores, no âmbito do Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina.

2.2 Condições de cultura e isolamento de *Mycoplasma bovis*

Alíquotas dos isolados do biobanco foram descongeladas e inoculadas em 5 ml de meio líquido Hayflick numa proporção de 1:10. A incubação realizou-se a 37 °C, numa atmosfera de 5 % de CO₂ ou com agitação a 150 rpm em aerobiose, até ser observado crescimento.

As amostras biológicas, de um *pool* de tecidos por animal, foram maceradas em 5 ml de soro fisiológico e o sobrenadante foi filtrado por filtro Millipore com 0,45 µm de poro e 25 mm de diâmetro em meio Hayflick, líquido 5 ml (6 gotas – cerca de 0,5 ml) e sólido (8 gotas – cerca de 0,6 ml). No caso do meio sólido (placa de 55 mm de diâmetro) o excesso de inóculo é removido com pipeta de Pasteur. Os tubos e as placas foram incubados a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂, até 10 dias.

Os isolados de *Mycoplasma bovis* do biobanco foram retestados neste trabalho em relação às características fenotípicas e genotípicas, de modo a confirmar a sua identidade, de acordo com os pontos 2.3.1 e 2.3.2. Procedeu-se da mesma forma para os isolados obtidos das amostras biológicas.

2.3 Identificação de espécies de micoplasmas

A identificação das espécies de micoplasmas baseia-se em critérios fenotípicos e genotípicos ⁽⁶⁾.

2.3.1 Testes bioquímicos – Identificação fenotípica

No caso dos critérios fenotípicos, foram realizados testes bioquímicos aos isolados obtidos e do biobanco para a confirmação da identidade. Os testes de fermentação da glucose, hidrólise da arginina, redução do tetrazólio e actividade fosfatásica foram realizados em meio

líquido. Em meio sólido foi avaliada a produção de “*Film and Spots*”, a sensibilidade à digitonina e feita a observação da morfologia das colônias.

Após a suspeita de micoplasma por observação de turvação ligeira em meio líquido, é feita uma subcultura de 0,5 ml para novo meio de cultura Hayflick sólido e líquido, para a realização de testes bioquímicos.

A cada meio líquido para provas bioquímicas (5ml) são adicionados 0,5 ml de subcultura, sendo a incubação realizada a 37 °C, em condições de aerobiose, durante 72 h ou até 10 dias consoante o crescimento da subcultura.

Para o teste de sensibilidade à digitonina, realizado em meio sólido Hayflick, usa-se um disco de papel de filtro embebido em solução saturada de digitonina a 1,5 % (solução alcoólica) que é colocado na zona central da placa. A incubação é feita a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂, até 10 dias.

2.3.2 Polimerase chain reaction – Identificação genotípica

A identificação molecular de *Mycoplasma bovis* foi feita por PCR tendo como alvo específico o gene rRNA16S, utilizando o par de *primers* *Mbo* F/R que amplificam para um fragmento de 360 pb (Tabela 2.1) ⁽⁴²⁾.

A identificação molecular de *Mycoplasma agalactiae* tem como alvo o gene rRNA 16S e é utilizado o par de *primers* *Mag* F2/R2, que amplificam para um fragmento de 734 pb (Tabela 2.1) ⁽⁴³⁾.

Tabela 2.1 – Sequências de *primers*, gene alvo e tamanho de produto de amplificação.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Gene Alvo</i>	<i>Amplicação</i>	<i>Referência</i>
<i>Mbo</i>F	5'-CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG-3'	rRNA 16S	360 pb	González, Y. R. C <i>et al.</i> , 1995 ⁽⁴²⁾
<i>Mbo</i>R	5'-CCGTCAAGGTAGCATCATTTCCTAT-3'			
<i>Mag</i>F2	5'-GAAGAAAAAGTAGCGTAGGAAATGAC-3'	rRNA 16S	734 pb	Bashiruddin, J. B <i>et al.</i> , 2005 ⁽⁴³⁾
<i>Mag</i>R2	5'-CGTCGTCCCTACCTTCCTCCCA-3'			

Nota: A negrito estão assinaladas as posições das diferenças nucleotídicas existentes entre *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma agalactiae* dentro do gene rRNA 16S.

2.3.2.1 Extração de DNA

Um mililitro de cultura líquida num *ependorf*, com cerca de 2 a 4 dias, foi centrifugado a 14000 rpm por 5 mim. O sedimento foi lavado duas vezes com 100 µl de PBS (150 mM tampão fosfato-salino) e ressuspenso em 25 µl de PBS. Posteriormente as amostras foram incubadas em termobloco a 95 °C por 10 min, seguido de 5 min a uma temperatura de -20 °C. Finalmente, o volume foi centrifugado a 14000 rpm por 5 mim e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo tubo *ependorf* (adaptado de Behbahan *et.al* 2005). Não foi executado nenhum passo de purificação do DNA ⁽⁶¹⁾. O DNA foi congelado a – 20 °C até posterior utilização.

2.3.2.2 Quantificação por nanodrop

Todos os DNAs deste estudo foram quantificados por método espectrofotométrico no aparelho Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA). O volume utilizado para cada leitura foi de 2 µl e a concentração de DNA foi normalizada a 40 ng/µl para todas as amostras.

2.3.2.3 Mistura de reacção e condições de amplificação

Para a identificação de *Mycoplasma bovis* e de *Mycoplasma agalactiae* foi utilizada uma mistura de reacção com um volume final de 25 µl contendo, água bidestilada estéril, 1X tampão de PCR sem MgCl₂ (5X Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 1,5 mM de MgCl₂ (25mM, Promega), 200 µM de dNTPs (10 mM, Promega), 1µM de cada *primer* (Alfagene®) e 1U de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µl, Promega).

Foram utilizados como controlo positivo DNA de *M. bovis* ou *M. agalactiae*, consoante o sistema de PCR e como controlo negativo água bidestilada estéril.

As amplificações foram realizadas num termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Biorad). Para *M. bovis* o programa consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, hibridação a 60 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 3 min ⁽⁴²⁾. Para *M. agalactiae* as condições da reacção foram: desnaturação inicial a 94 °C por 9 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, hibridação a 64 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72°C por 3 min ⁽⁴³⁾.

2.3.2.4 Electroforese e visualização do DNA

Para a electroforese dos produtos de amplificação, cinco microlitros de volume de reacção foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1,5 % ou 2 % (p/v) corado com Redsafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (iNtRON Biotechnology). A electroforese foi feita a 8 V/cm por uma hora. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o Hyperladder™ 100 pb (Bioline). A visualização dos géis foi realizada num transiluminador UVP BioDoc-It® Imaging System (UVP, LLC (Analytik Jena AG)).

2.4 Cálculo da frequência de isolamentos de *Mycoplasma bovis* e de co-infecção com *Mycobacterium bovis*

A frequência relativa de isolamentos de *Mycoplasma bovis* foi calculada para cada Direcção de serviços de alimentação e veterinária regional (DSAVR) com base no número de amostras analisadas. O cálculo foi também realizado a nível de Portugal continental e região autónoma dos Açores.

Em amostras com isolamento de *Mycoplasma bovis* foi também feito o cálculo da frequência relativa de co-infecção com *Mycobacterium bovis*.

2.5 **Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)**

Para a análise MLVA de isolados de *Mycoplasma bovis*, foi necessário efectuar a estandardização da interpretação dos resultados visto que para o género *Mycoplasma* este processo não está feito o que dificulta a comparação de dados de diferentes autores. De facto, não existe nenhum acordo internacional específico para interpretação da dimensão dos fragmentos, identificação da sequência repetida e numeração das repetições, o que leva a inconsistências nos perfis finais, dependendo do autor. No entanto, existem consensos e orientações gerais para a interpretação dos dados da técnica de MLVA em geral ^(59,62) e propostas de interpretação desta técnica para *Mycoplasma pneumonia* ⁽⁶³⁾ mas não especificamente para *M. bovis*. Neste trabalho, foi seleccionado um painel de 12 *loci* para a análise MLVA em *M. bovis*: nove descritos no estudo de Pinho *et al.*, 2012 (*loci* MbovTR14, MbovTR29, MbovTR30, MbovTR31, MbovTR35, MbovTR40-41, MbovTR49-51, MbovTR52, MbovTR59) e três no de Spargser *et al.*, 2013 ^(52,53) (*loci*, MbovTR147, MbovTR148, MbovTR427) (Tabela 2.2).

2.5.1 **Análise *in silico***

Para confirmação da localização e para análise de sequências repetidas em tandem no genoma de PG45^T, com número de acesso, GenBank: NC_014760.1, foi utilizado o programa *Tandem Repeats Finder* versão 4.09 (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), com os parâmetros, *match*, *missmatch*, *indel* (2,7,7) ^(52,53,64). Assim, determinou-se a sequência padrão de consenso, a dimensão da unidade de repetição e o número de repetições em tandem para cada *locus*. As sequências flanqueadoras, o local de hibridação de cada *primer* e a dimensão dos amplicões esperados para cada *locus* (Anexo A2) foram obtidos usando os programas Word 2016 e Excel 2016.

Foram obtidas também por análise *in silico* na base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=mycoplasma+bovis>) as informações relativamente aos *loci* estudados, pois houve uma actualização na anotação do genoma de *Mycoplasma bovis* passando a haver novas designações e funções reconhecidas para os *loci*.

2.5.2 **Cálculo do número de repetições em cada *locus***

O número de cópias de repetição em tandem de um *locus* (alelo) foi deduzido com base no tamanho do fragmento amplificado de acordo com a seguinte fórmula ⁽⁵⁹⁾:

$$\text{Número de cópias} = \frac{\text{Tamanho do fragmento (pb)} - \text{Sequências flanqueadoras (pb)}}{\text{Unidade de repetição (pb)}}$$

O número de cópias foi arredondado até à décima (p. ex. 2,1666 = 2,2; 3,9555 = 4,0).

Para casos em que não foi obtida qualquer amplificação foi atribuído o valor de 0,0 (alelo nulo). Os alelos nulos foram confirmados num segundo PCR após nova extracção de DNA, e a integridade do DNA foi confirmada por PCR, em paralelo, com outro *locus* VNTR. Para o caso

de amplificações de vários fragmentos (“multibanda”), quando não foi possível a observação de banda mais intensa, foi considerada a codificação de espaço em branco.

2.5.3 Mistura de reacção, condições de PCR, electroforese e visualização dos produtos de amplificação.

A mistura de reacção e condições de PCR foram adaptadas de Spargser *et al.*, 2013. Deste modo, para uma reacção com volume total de 25 µl, foi utilizada água bidestilada estéril, tampão de reacção PCR 1X sem MgCl₂ (10X PCR Buffer II, Applied Biosystems), 2,5 mM de MgCl₂ (25 mM, Applied Biosystems), 0,1 mM de dNTPs (10 mM, Promega), 400 nM de cada *primer* F/R (alíquotas a 10 µM, Nzytech, Lda,) e 1,25 U de AmpliTaq® DNA Polymerase (5 U/µl, Applied Biosystems).

As amplificações foram realizadas num termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Biorad). As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C, 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C, 40s, hibridação entre 54 °C e 60 °C de acordo com o par de *primers* (Tabela 2.2), 40s, extensão a 72°C, 100s e por fim a extensão final a 72 °C por 5 min (52,53).

Tabela 2.2 – Sequência dos *primers* para amplificação dos 12 *loci* utilizados na análise MLVA e respectivas temperaturas de hibridação

<i>Loci</i>	Sequências dos <i>primers</i>	Temperatura de Hibridação (°C)	Referência
MbovTR14	5' – AACATTGTTGACACAATGCCATC – 3' 5' – CGCTGCTTTTTTCGTCCTCC – 3'	56	Pinho <i>et al.</i> , 2012 (52)
MbovTR29	5' – ATCTAATCAGTAATTGCATGCTTAG – 3' 5' – TCCTAATAAGTAGACAACGAACAG – 3'	54	
MbovTR30	5' – TGTTTCAGCAGGTATAGAGTCAG – 3' 5' – GATAGCTGCTTCATGTGATGG – 3'	55	
MbovTR31	5' – ACTTAAATTGTGAGTAATAGTTCCACTC – 3' 5' – GCAATATTTTTTTGATCATATCTCGCATC – 3'	56	
MbovTR35	5' – GTTGTATCATTTTGAATGGGGTCTATC – 3' 5' – TCGCTAGCTATGCCACTAGTA – 3'	56	
MbovTR40-41	5' – TCCAAGAATTTATAAAGGAGTACTTGG – 3' 5' – CTGATGCTTCTTTTCCGTATTCC – 3'	56	
MbovTR49-51	5' – GAAAGCATCCTTTTGTCTTCTATGAT – 3' 5' – TAGTAAATCCAAACGAAACAGATGATG – 3'	56	
MbovTR52	5' – CATCATGTCAAAACAAGAATCGAACAGA – 3' 5' – CTTATGACCAAGGCGACCACGA – 3'	60	
MbovTR59	5' – TGAATCTTGATCTTTTGGTCTGAGT – 3' 5' – CTAGTTGCATCGCCGAAGC – 3'	57	
MbovTR147	5' – AGGCTCTGTCTTACCTGGATT – 3' 5' – AAATGGTGCTCCTATTTTCAAAC – 3'	56	Spargser <i>et al.</i> , 2013 (53)
MbovTR148	5' – TCACTGTGCATAGGCTCTGTCT – 3' 5' – AGCTTGGTGTGTGGACTCG – 3'	59	
MbovTR427	5' – TCTATGGTGTGAATCCTACCA – 3' 5' – CAATAGTCGCTGCTGCATGT – 3'	57	

A electroforese em gel de agarose foi efectuada de acordo com o ponto 2.3.2.4, durante 2 h, utilizando como marcadores moleculares TrackIt™ 25 bp DNA Ladder, 50 bp DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), de acordo com o produto de amplificação esperado. A visualização dos produtos foi realizada de acordo com o ponto 2.3.2.4.

2.5.4 Codificação dos perfis MLVA e análise de dados – Dendrogramas e árvores de extensão mínima

Para possibilitar a comparação com dados de outros autores (Pinho *et al.*, 2012, Sulyok *et al.*, 2014 e Becker *et al.*, 2015), foi elaborada uma tabela para a codificação dos perfis MLVA, obtidos com base na dimensão do fragmento observada para cada *locus* em gel de agarose, tendo também em conta os alelos já descritos por Pinho *et al.*, 2012, Sulyok *et al.*, 2014 e Becker *et al.*, 2015, (Tabela 3.6), atribuindo o algarismo 1 ao fragmento com menor número de repetições e um algarismo sequencialmente superior aos fragmentos com maior número de repetições ^(52,54,55).

A análise da relação genética dos perfis MLVA de *Mycoplasma bovis* foi realizada no software Bionumerics versão 7.6 (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Foi obtido um dendrograma utilizando o coeficiente categórico como coeficiente de associação de semelhança e UPGMA como método aglomerativo. O limite de corte foi estabelecido em 55 % para a determinação dos *clusters* MLVA.

Foram também obtidas árvores de extensão mínima (MST – *Minimum Spanning Tree*), utilizando o coeficiente categórico, para a comparação entre perfis MLVA obtidos no presente estudo, e também com perfis obtidos por outros autores. Para este último caso foram apenas considerados os *loci* descritos em Pinho *et al.*, 2012. A formação de complexos clonais (CC) foi feita com base numa diferença máxima de um *locus*, tendo sido considerado o número mínimo de dois indivíduos por grupo e número mínimo de dois nós no grupo, para evitar a criação de CC com uma única estirpe e CC com um só nó (*single-node complexes*) ⁽⁵²⁾.

2.5.5 Índice de diversidade dos *loci* e poder discriminatório da técnica MLVA

Foi calculado o índice de diversidade Hunter e Gaston (HGDI) dos *loci* utilizados e poder discriminatório da técnica MLVA recorrendo à ferramenta V-Dice (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>). No caso do poder discriminatório da técnica MLVA o cálculo é feito com base no perfil MLVA obtido para cada estirpe (Tabela 3.7).

Capítulo 3 – Resultados

3.1 Isolamento e identificação de *Mycoplasma bovis* em amostras com suspeita de tuberculose bovina.

Das 303 amostras analisadas com suspeita de tuberculose bovina, obtiveram-se nove culturas que foram consideradas *Mycoplasma spp.* pelo teste positivo de sensibilidade à digitonina e morfologia das colónias. Em seguida foi feita a identificação fenotípica e genotípica. Os resultados obtidos constam da Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Identificação bioquímica e molecular dos isolados de *Mycoplasma spp.*

Isolados (ID)	Sensibilidade à digitonina	Fermentação da glucose	Hidrólise da arginina	Redução do tetrazólio	Actividade fosfatásica	Produção de “Film and Spot”	PCR Mbov (pb)	PCR Mag2 (pb)	Identificação
367	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
368	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
6296	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
7298	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
7868	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
8721	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
11154	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
17096	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
17230	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
Estirpes de referência									
<i>M. bovis</i> PG45 ^T	+	-	-	+	+	+	360	-	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>M. agalactiae</i> PG2 ^T	+	-	-	+	+	+	-	734	<i>Mycoplasma agalactiae</i>

Legenda: (+) reacção positiva, (-) reacção negativa.

O teste de fermentação da glucose é positivo se o indicador do meio alterar de vermelho para amarelo. O teste de hidrólise da arginina é positivo se o indicador do meio alterar de amarelo para carmim forte. O teste da redução do tetrazólio é positivo se no meio se formar uma forma insolúvel vermelho tijolo (formação). O teste da actividade fosfatásica é positivo se após a adição de NaOH 5M, o meio vira de amarelo para cor carmim. A produção de “Film and Spot” é verificada na placa, que é visualizada por lupa ou microscopicamente. Os spots apresentam cor negra e surgem em redor das colónias. O filme é evidenciado pela opacidade do meio de cultura em exame macroscópico e por exame microscópico pela característica enrugada e cor perolada. Foram usadas como estirpes de referência *Mycoplasma bovis*, PG45^T e *Mycoplasma agalactiae*, PG2^T. Os resultados foram comparados com a informação de identificação bioquímica de micoplasmas de referência de bovinos e de pequenos ruminantes (Anexo A1).

3.2 Frequências de isolamento de *Mycoplasma bovis* e co-infecção com *Mycobacterium bovis*, por região geográfica

A frequência de isolamentos de *Mycoplasma bovis* foi calculada para cada região geográfica (Direcção de serviços de alimentação e veterinária regional - DSAVR) (Tabela 3.2). Nas nove amostras com isolamento de *Mycoplasma bovis* foi também feito o estudo de co-infecção com *Mycobacterium bovis* (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 – Frequências relativas de isolamentos de *Mycoplasma bovis* por região geográfica

	Portugal Continental	DSAVR N	DSAVR C	DSAVR LVT	DSAVR ALT	AÇORES
Número de amostras	300*	60	27	28	185	3
Isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i>	9	4	1	4	0	0
Frequência relativa	3,0 %	6,7 %	3,7 %	14,3 %	0,0 %	0,0 %

Legenda: DSAVR – Direcção de serviços de alimentação e veterinária regional; N – norte; C – centro; LVT – Lisboa e Vale do Tejo; ALT – Alentejo. * Foram excluídas as 3 amostras dos Açores para o cálculo da frequência em Portugal continental.

Tabela 3.3 – Co-infecção com *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium bovis*

Amostra com isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i> (ID)	Anatomopatologia	Isolamento de <i>Mycobacterium bovis</i>	DSAVR	DAV
367	Sem informação	Negativo	Lisboa e Vale do Tejo	Ribatejo
368	Sem informação	Positivo	Norte	Vila Real – Douro Sul
6296	Sinais de pneumonia arrastada e lesões de bronquite crónica	Negativo	Centro	Viseu
7868	Sinais de pneumonia arrastada e lesões de bronquite crónica	Negativo	Lisboa e Vale do Tejo	Setúbal
17096	Lesões de pneumonia granulomatosa	Negativo	Lisboa e Vale do Tejo	Oeste
17230	Lesões de pneumonia granulomatosa	Negativo	Lisboa e Vale do Tejo	Ribatejo
7298	Sem informação	Positivo	Norte	Braga
8721	Sem lesões	Negativo	Norte	Porto
11154	Sem informação	Negativo	Norte	Vila Real – Douro Sul

Legenda: DSAVR – Direcção de serviços de alimentação e veterinária regional. DAV – Direcção de alimentação e veterinária. Os dados de Anatomopatologia e de isolamento de *Mycobacterium bovis* foram obtidos da base de dados do INIAV, IP.

No total foram identificados nove isolados de *Mycoplasma bovis*, em casos em que a suspeita era de *Mycobacterium bovis*. Verificou-se co-infecção com *Mycobacterium bovis* em duas das nove amostras, o que representa 22,2 % das amostras com isolamento de *Mycoplasma bovis* (n=9) e 0,7 % do total das amostras (n= 303). As co-infecções verificadas situam-se geograficamente na DSAVR Norte, representado 3,3 % nas amostras analisadas daquela região (n=60, Figura 3.1).

DIREÇÃO GERAL DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA

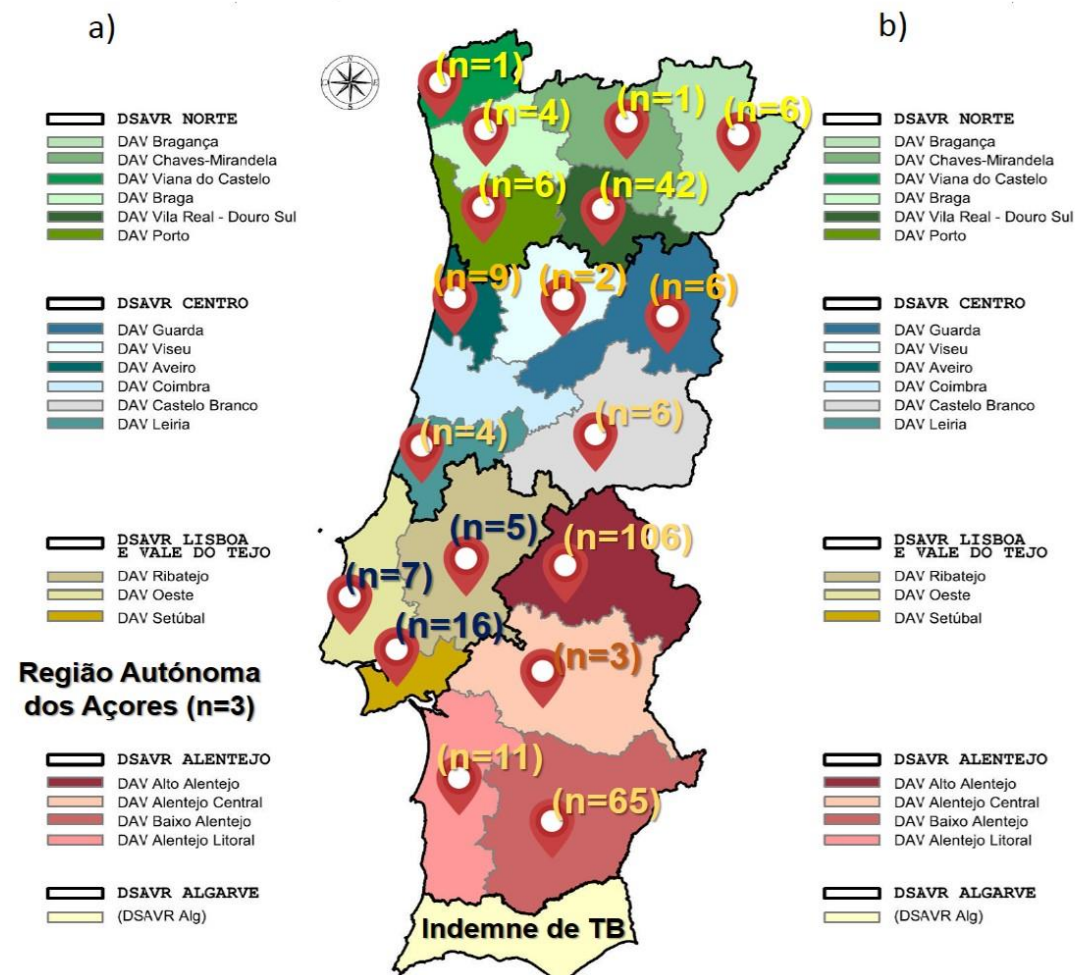


Figura 3.1 – a) Distribuição geográfica das amostras analisadas (n=303). b) Distribuição geográfica dos isolados de *Mycoplasma bovis* e co-infecção (*) com *Mycobacterium bovis*. São considerados os limites das unidades orgânicas das Direcções de Serviços de Veterinária Regionais (DSAVR) e respectivas Direcções de alimentação e veterinária (DAV).

3.3 Análise *in silico* do genoma da estirpe tipo de *Mycoplasma bovis* (PG45^T).

Após a análise do genoma da estirpe tipo PG45^T no programa *Tandem Repeats Finder* (TRF), foram deduzidas a sequência e dimensão da unidade de repetição para cada *locus* (Tabela 3.4). Foram também obtidas informações relativas aos *loci* estudados segundo a mais recente anotação do genoma da estirpe tipo, na base de dados do NCBI.

Tabela 3.4 – Características dos 12 *loci* utilizados para a análise MLVA em *Mycoplasma bovis* com base na estirpe de referência PG45^T

VNTR	Padrão de consenso (dimensão da repetição pb)	Amplicação (pb)	Número de cópias	Porcentagem de matches	Posição no Genoma (pb) ¹	Localização no Genoma	Alias	Ref.
MbovTR14	ATAGTGCTAACAATAGCAGTAGTGAAAGTGACAAGAGT AAAAATGCAGACAACCTCAAATTCAAATAGTAATTCAAAC GTAAACA (84pb)	555	2,2	97	203992-204173	MBOVPG45_RS00875 ²	MBOVPG45_0177	Pinho <i>et al.</i> , 2012
MbovTR29	AGCCACTAGAACTTACTTTGACTACTACCTATTATTTGTA TAAATTTTGTTAACTTGACTAGCTACTGTTTACTTGATAT TTCTTAGCAAACCTATAGCCTTATATAGCCTTGTA (116pb)	860	4,8	98	246374-246927	Região intergénica não codificante entre MBOVPG45_RS01060 e MBOVPG45_RS01065	Região intergénica não codificante entre MBOVPG45_0212 e MBOVPG45_0213	
MbovTR30	TTCAGCTACTTTTTAGAACTCTTCTTTCAACTGGATCT TTAATTTCTTT (51 pb) *	217	2,3	81	270575-270689	MBOVPG45_RS01170 ²	MBOVPG45_0234	
MbovTR31	AGGGTCATCTTTTGTCTTTTCTTTTACTCTTATCTTCT TGATCGTTTTGATTACCTTGAGTTTGTTGGGAAGTATTT GAAGAAGAAGTATCAGAACCACT (102pb)	987	5,8	99	271868-272455	MBOVPG45_RS04355 ²	MBOVPG45_0236	
MbovTR35	TCTGATGGTTTAGATCTTGAACCTGTTCTGATGGTTTG GTTGTG (45pb)	242	4,0	92	490323-490500	MBOVPG45_RS02115 ²	MBOVPG45_0423	
MbovTR40-41	AACTCACAATCTAAATCAGAAAATCAAGATTCAGAAACA (39pb)	661	4,0	87	500560-500714	MBOVPG45_RS02145 ²	MBOVPG45_0430	
MbovTR49-51	TTTCTTTTCTTCTCTAATTTCTCTTGCTTTTCATCTTCTA TTTT (45pb)	209	2,2	87	574265-574362	MBOVPG45_RS02470 ²	MBOVPG45_0498	
MbovTR52	CCTAGTGGTTCTGGTAATTTCTTCCAAATACTACCCCA CAAACCTCAAGATAATCAAACCAACCAAGAAGATAATATT AAAGAAAAGAACAAGTGATGAC (102pb)	666	4,0	97	589763-590175	MBOVPG45_RS04435 ²	MBOVPG45_0512	
MbovTR59	ATCTTGTTTTGTTTATCGTTTCATTGTTTCAGAAGAATTT TTTTCATCTGTATGTTCAATTTTCATACTCTTGCCTTCTT CAGATTTTGAAGAGTCTTTATCTGTTTTTCTTCCATCTT TGAATCTATACTGCTTTT (138 pb)	428	2,4	98	666384-666720	MBOVPG45_RS02835 ³	MBOVPG45_0572	
MbovTR147	CAGGATCAGTAGGCGGAGCGATTGGAGCATCAATTTCA GGTTCCTTTTAGGCTCCTTAGTTTCATTATTTTAC (75pb)	500	2,0	94	163239-163388	MBOVPG45_RS00725 ²	MBOVPG45_0147	Spersger <i>et al.</i> , 2013
MbovTR148	CAGGATCAGTAGGCGGAGCGATTGGAGCATCAATTTCA GGTTCCTTTTAGGCTCCTTAGTTTCATTATTTTAC (75 pb)	474	2,0	94	164989-165138	MBOVPG45_RS00730 ²	MBOVPG45_0148	
MbovTR427	TTTGGTCCTTTTGGTCTTTTGGAGAAGTTTGGTCTTTT GGTCTTTTGGAGGGTTGATCCTTTTGGTTTTTGGAG GAGTTTGTCTTCGTGGTCTTTTGGAGG (108 pb)	599	3,5	95	496898-497269	MBOVPG45_RS02130 ³	MBOVPG45_0427	

*O padrão de consenso tem 52 pb, mas a dimensão da repetição tem 51 pb por ser a média entre cópias adjacentes obtida pelo programa TRF. ¹A posição do genoma (pb) contempla apenas o valor do número de cópias (com repetição intermédia). ² Dentro de pseudogene. ³ Dentro de proteína hipotética.

3.4 Tipificação dos isolados de *Mycoplasma bovis* por MLVA

A tipificação por MLVA foi realizada em 68 isolados de *Mycoplasma bovis* (incluindo a estirpe tipo PG45^T) tendo sido obtidos 55 perfis diferentes (Tabela 3.5). O locus MbovTR49-51 não foi considerado e foi excluído da análise por ter gerado sempre perfis que não se conseguiam interpretar (padrão multibanda) mesmo após tentativa de optimização das condições PCR. Para a nossa população de isolados *M. bovis*, os *loci* que apresentaram menor número de perfis sem amplificação de repetições (alelo nulo – 0,0) foram: MbovTR30, MbovTR35, MbovTR52, MbovTR59, MbovTR147, MbovTR148 e MbovTR427.

Tabela 3.5 – Tipificação por MLVA dos isolados de *Mycoplasma bovis* analisados

ID Estirpe/Isolados	Data isolamento	Tipo de Amostra	Região Geográfica	Mbov TR14	Mbov TR29	Mbov TR30	Mbov TR31	Mbov TR35	Mbov TR40-41	Mbov TR52	Mbov TR59	Mbov TR147	Mbov TR148	Mbov TR427
PG45 ^T	1961	Leite	EUA	2,2	4,8	2,3	5,8	4,0	4,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,5
5394	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,0
7131	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	1,8	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	1,4	2,0	1,0	3,5
7266	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	1,8	2,3	3,8	2,0	0,0	4,0	1,4	2,0	1,0	3,5
7507	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	0,0	3,4	2,0	2,0	0,0
7524	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	1,4	2,0	2,0	0,0
9403	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	0,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9404	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9411	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9413	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9415	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	1,8	3,3	4,0	2,5	8,0	4,0	1,0	4,0	1,0	3,5
9421	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	3,8	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9422	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	1,8	3,3	4,0	2,5	8,0	4,0	1,0	2,0	1,0	3,5
9426	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	3,8	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9431	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
9598	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	1,4	2,0	0,0	4,0
9603	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	1,4	2,0	2,0	4,0

(Tabela 3.5 continuação)

ID Estirpe	Data	Tipo de Amostra	Região Geográfica	Mbov TR14	Mbov TR29	Mbov TR30	Mbov TR31	Mbov TR35	Mbov TR40-41	Mbov TR52	Mbov TR59	Mbov TR147	Mbov TR148	Mbov TR427
9877	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,0
10321	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0
10655	1997	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	3,8	2,0	3,0	4,0	2,4	2,0	1,0	3,5
5396 (?)	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	2,0	1,0	3,5
2979/97	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,0
9630/97	1997	Desconhecida	Portugal	2,2	2,8	3,3	4,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
794	1998	Desconhecida	Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	1,4	2,0	2,0	4,0
2187	1998	Desconhecida	Portugal	2,2	5,8	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,0
9412	1998	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	4,0	1,0	3,5
10579/98	1998	Desconhecida	Portugal	2,2	1,8	3,3	6,8	2,5	8,0	4,0	2,4	2,0	1,0	3,5
1203 19v17	1999	Desconhecida	Hungria	2,2	0,0	2,3	0,0	2,0	0,0	4,0	2,4	2,0	1,0	3,5
778	2003	Zaragatoa nasal	Coruche/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,5
778/2	2003	Zaragatoa nasal	Coruche/Portugal	2,2	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	2,0	1,5
6373	2003	Pulmão	Alenquer/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
6517	2003	Pulmão	Vila Verde/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	1,0	2,0	2,0	3,0
7657	2003	Pulmão	Torres Vedras/Portugal	2,2	3,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
9447	2003	Desconhecida	Torres Vedras/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
11482	2003	Desconhecida	Portugal	2,2		3,3	0,0	2,5	8,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,5
11871	2003	Traqueia	Montijo/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
17318	2003	Pulmão	Barcelos/Portugal	2,2	2,8	3,3	5,0	2,5	8,0	4,0	1,4	1,0	2,0	4,0
17329	2004	Pulmão	Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	8,0	4,0	1,4	1,0	2,0	4,0
3201/990	2004	Pulmão	Matosinhos/Portugal	2,2		3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
3201/991	2004	Gânglio	Matosinhos/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0

(Tabela 3.5 continuação)

ID Estirpe	Data	Tipo de Amostra	Região Geográfica	Mbov TR14	Mbov TR29	Mbov TR30	Mbov TR31	Mbov TR35	Mbov TR40-41	Mbov TR52	Mbov TR59	Mbov TR147	Mbov TR148	Mbov TR427
3201/992	2004	Pulmão	Matosinhos/Portugal	2,2		3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
3201/993	2004	Zaragatoa nasal	Matosinhos/Portugal	2,2		3,3	0,0	2,5	0,0	0,0	2,4	2,0	2,0	0,0
3569/1047912	2004	Desconhecida	Póvoa do Varzim/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	1,5
25645/855	2005	Leite	Guimarães/Portugal	4,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	1,4	2,0	2,0	3,0
25645/8591	2005	Leite	Guimarães/Portugal	4,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	1,4	2,0	2,0	3,0
41351/6178	2005	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0		2,0	0,0	0,0
36490/21331	2006	Leite	Santarém/Portugal	0,0	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	3,0	2,4	2,0	2,0	3,0
36490/21334	2006	Desconhecida	Santarém/Portugal	2,2	2,8	3,3	4,0	2,5	10,0	3,0	2,4	2,0	2,0	3,0
36490/21335	2006	Leite	Santarém/Portugal	0,0	2,8	3,3	4,0	2,5	0,0	3,0	2,4	2,0	2,0	3,0
48162	2007	Desconhecida	Portalegre/Portugal	2,2		3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
159	2009	Desconhecida	Porto/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	4,5
367	2015	Pulmão e Gânglio	Cartaxo/Portugal	0,0	1,8	3,3	6,8	2,5	8,0	4,0	1,0	0,0	1,0	3,5
368	2015	Gânglio	Vila Real/Portugal	3,2	1,8	3,3	6,8	2,5	8,0	4,0	1,0	2,0	1,0	3,5
6296	2015	Pulmão e Gânglio	Viseu/Portugal	2,2	2,8	3,3	0,0	2,5	10,0	4,0	2,4	2,0	2,0	3,0
7298	2015	Pulmão e Gânglio	Braga/Portugal	3,2	1,8	3,3	6,8	2,5	9,0	4,0	1,0	2,0	1,0	3,5
7868	2015	Pulmão	Setúbal/Portugal	0,0	1,8	3,3		2,5	8,0	4,0	1,0	2,0	1,0	3,5
8721	2015	Pulmão e Gânglio	Penafiel/Portugal	0,0	1,8	3,3	4,0	2,5	8,0	4,0	1,0	2,0	1,0	3,5
11154	2015	Gânglio	Vila Real/Portugal	3,2	1,8	3,3	6,8	2,5	8,0	4,0	0,4	2,0	1,0	3,5
17096	2015	Pulmão	Alenquer/Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
17230	2015	Pulmão	Cartaxo/Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	0,0	0,0	1,0	3,5
P11	2015	Pulmão	Nigéria	0,0	0,8	3,3	0,0	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0
2668	2017	Pulmão	Torres Vedras/Portugal	0,0	1,8	3,3	0,0	2,5	8,0	4,0	1,0	2,0	1,0	

(Tabela 3.5 continuação)

ID Estirpe	Data	Tipo de Amostra	Região Geográfica	Mbov TR14	Mbov TR29	Mbov TR30	Mbov TR31	Mbov TR35	Mbov TR40-41	Mbov TR52	Mbov TR59	Mbov TR147	Mbov TR148	Mbov TR427
27529	>2000	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	4,0	2,4	2,0	1,0	0,0
40560	>2000	Leite	Portugal	0,0	0,0	3,3	0,0	2,5	0,0	3,0	2,4	2,0	2,0	3,0
219544	>2000	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,5	0,0
21514-02	>2000	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	4,0	0,0	9,0	0,0	0,0
21514-06	>2000	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0	9,0	0,0	2,0
BM-65136	>2000	Desconhecida	Portugal	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	3,7	9,0	0,5	2,0

3.5 Estandarização dos perfis alélicos

Com base na análise *in silico* da estirpe PG45, nos resultados obtidos neste trabalho e nos resultados de Pinho *et al.*, 2012, Sulyok *et al.*, 2014 e Becker *et al.*, 2015, foi elaborada a Tabela 3.6 que inclui, para cada *locus*, as dimensões dos fragmentos amplificados (pb), o número de repetições correspondente e a codificação atribuída (p1 a p9), com base no critério de atribuição do valor de 1 para o menor amplicão e de valores crescentes sequenciais até ao maior amplicão observado (ver 2.5.4). Os valores que constam na Tabela 3.6 foram calculados em EXCEL 2016 de acordo com 2.5.1 e 2.5.2 (ver materiais e métodos).

Tabela 3.6 – Codificação de alelos para os 11 *loci* VNTR analisados.

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9
<i>Locus (estirpe tipo PG45 T)</i>									
MbovTR14_84pb_555pb_2,2u	555 (2,2 u)	639 (3,2 u)	723 (4,2 u)						
MbovTR29_116pb_860pb_4,8u	396 (0,8 u)	512 (1,8 u)	628 (2,8 u)	744 (3,8 u)	860 (4,8 u)	976 (5,8 u)	1788 (12,8 u)		
MbovTR30_51pb_217pb_2,3u	166 (1,3 u)	217 (2,3 u)	268 (3,3 u)	319 (4,3 u)					
MbovTR31_102pb_987pb_5,8u	681 (2,8 u)	783 (3,8 u)	807 (4,0 u)	855 (4,8 u)	909 (5,0 u)	987 (5,8 u)	1089 (6,8 u)	1191 (7,8 u)	
MbovTR35_45pb_242pb_4,0u	150-152 (2,0 u)	176 (2,5 u)	193-197 (3,0 u)	238-242 (4,0 u)					
MbovTR40-41_39pb_661pb_4,0u	620-622 (3,0 u)	658-661 (4,0 u)	696-700 (5,0 u)	734-739 (6,0 u)	810-817 (8,0 u)	848-856 (9,0 u)	886-895 (10,0 u)	924-934 (11,0 u)	1456-1480 (25,0 u)
MbovTR52_102pb_666pb_4,0u	360 (1,0 u)	462 (2,0 u)	564 (3,0 u)	666 (4,0 u)	768 (5,0 u)	870 (6,0 u)	972 (7,0 u)		
MbovTR59_138pb_428pb_2,4u	152 (0,4 u)	229 (1,0 u)	290 (1,4 u)	428 (2,4 u)	566 (3,4 u)	600 (3,7 u)			
MbovTR147_75pb_500pb_2,0u	425 (1,0 u)	500 (2,0 u)	650 (4,0 u)	1025 (9,0 u)					
MbovTR148_75pb_474pb_2,0u	369 (0,5 u)	399 (1,0 u)	474 (2,0 u)						
MbovTR427_108pb_599pb_3,5u	383 (1,5 u)	443 (2,0 u)	551 (3,0 u)	599 (3,5 u)	659 (4,0 u)	707 (4,5 u)			
		Comum a Este estudo; Pinho <i>et al.</i> , 2012; Sulyok <i>et al.</i> , 2014; Becker <i>et al.</i> , 2015					Comum a Pinho <i>et al.</i> , 2012; Sulyok <i>et al.</i> , 2014		
		Comum a Este estudo; Pinho <i>et al.</i> , 2012; Sulyok <i>et al.</i> , 2014;					Comum a Pinho <i>et al.</i> , 2012; Becker <i>et al.</i> , 2015		
		Comum a Este estudo; Pinho <i>et al.</i> , 2012; Becker <i>et al.</i> , 2015					Este estudo		
		Comum a Pinho <i>et al.</i> , 2012; Sulyok <i>et al.</i> , 2014; Becker <i>et al.</i> , 2015					Pinho <i>et al.</i> , 2012		
		Comum Este estudo; Pinho <i>et al.</i> , 2012					Sulyok <i>et al.</i> , 2014		
		Comum Este estudo; Sulyok <i>et al.</i> , 2014;					Becker <i>et al.</i> , 2015		
		Comum Este estudo; Becker <i>et al.</i> , 2015							

Os VNTR são identificados por designação_tamanho da repetição(pb)_fragmento correspondente(pb)_número de cópias(u). Para alelos nulos é atribuído o valor de 0 que corresponde a p0.

Os alelos observados pela primeira vez, neste estudo, foram: Para MbovTR29 o alelo 976 (5,8 u); Para MbovTR31 os alelos 807 pb (4,0 u) e 909 pb (5,0 u); Para MbovTR 40-41 os alelos 848-856 (9,0 u) e 886-895 (10,0 u); Para MbovTR35 o alelo 176 pb (2,5 u), que eventualmente poderá ser o mesmo de Becker *et al.*, 2015; Para MbovTR52 o alelo 972 (7,0 u); Para MbovTR59 os alelos 152 (0,4 u), 229 pb (1,0 u), 566 (3,4 u) e 600 pb (3,7 u);

Relativamente aos *loci* MbovTR147, MbovTR148 e MbovTR427, não existe possibilidade de comparação com outros estudos. Destacam-se para MbovTR427 os alelos 443 pb (2,0 u) 551 pb (3,0 u) e 659 pb (4,0 u), que supostamente não incluem a repetição intermédia.

Todos os outros alelos para os diferentes *loci* já tinham sido observados anteriormente por outros autores.

Com base neste critério de codificação, foram obtidos 55 perfis diferentes (Tabela 3.7) sendo predominante o perfil 00201044324 (MbovTR14-MbovTR29-MbovTR30-MbovTR31-MbovTR35-MbovTR40-41-MbovTR52-MbovTR59-MbovTR147-MbovTR148-MbovTR427), em cinco estirpes.

Tabela 3.7 – Perfis MLVA obtidos com base em 11 *loci* nos isolados de *Mycoplasma bovis*

Perfis alélicos nos <i>loci</i>											Número de Isolados
MbovTR14	MbovTR29	MbovTR30	MbovTR31	MbovTR35	MbovTR40-41	MbovTR52	MbovTR59	MbovTR147	MbovTR148	MbovTR427	
0	0	2	0	1	0	4	4	3	2	4	5
1	3	3	0	2	7	4	4	2	3	3	4
1		3	0	2	7	4	4	2	3	3	4
1	0	3	0	2	0	4	4	2	3	5	2
3	3	3	0	2	7	4	3	2	3	3	2
0	0	2	2	1	0	4	4	3	2	4	2
1	5	2	6	4	2	4	4	2	3	4	PG45
0	2	3	3	2	5	4	2	2	2	4	1
0	2	3		2	5	4	2	2	2	4	1
1	3	3	0	2	7	4	4	2	3	5	1
0	2	2	0	1	0	4	3	2	2	4	1
0	2	2	2	1	0	4	3	2	2	4	1
1	0	3	0	2	0	0	5	2	3	0	1
0	0	3	0	2	0	4	3	2	3	0	1
0	0	2	0	1	0	0	4	3	2	4	1
1	0	3	0	2	0	4	3	2	0	5	1
1	3	3	0	2	7	4	3	2	3	5	1
0	0	3	0	2	0	0	0	2	2	0	1
0	0	2	2	1	1	4	4	2	2	4	1
1	3	3	3	2	7	4	4	2	3	3	1
1	0	3	0	2	0	4	3	2	3	5	1
1	6	3	0	2	0	4	4	2	3	5	1
1	2	3	7	2	5	4	4	2	2	4	1
1	0	2	0	1	0	4	4	2	2	4	1
1	3	3	0	2	0	4	4	2	3	6	1
1	3	3	0	2	7	4	2	2	3	3	1
1	4	3	0	2	7	4	4	2	3	3	1
1		3	0	2	5	4	4	2	3	6	1
1	3	3	5	2	5	4	3	1	3	5	1
1	0	3	0	2	0	4	4	2	3	1	1
1	3	3	0	2	5	4	3	1	3	5	1
1		3	0	2	0	4	4	2	3	0	1
1	3	3	0	2	7	4	4	2	3	1	1
0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
0	3	3	0	2	7	3	4	2	3	3	1
1	3	3	3	2	7	3	4	2	3	3	1
0	3	3	3	2	0	3	4	2	3	3	1
1	3	3	0	2	7	4	4	2	3	6	1
0	2	3	7	2	5	4	2	0	2	4	1
2	2	3	7	2	5	4	2	2	2	4	1
2	2	3	7	2	6	4	2	2	2	4	1
2	2	3	7	2	5	4	1	2	2	4	1
0	0	3	0	2	0	0	0	0	2	0	1
0	0	3	0	2	0	4	0	0	2	4	1
0	1	3	0	0	0	2	2	0	2	0	1
0	2	3	0	2	5	4	2	2	2		1
1	2	3	3	2	5	4	2	3	2	4	1
1	2	3	3	2	5	4	2	2	2	4	1
0	0	3	0	2	0	4	4	2	2	0	1
0	0	3	0	2	0	3	4	2	3	3	1
0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1
0	0	0	0	2	0	4	0	4	0	0	1
0	0	0	0	0	0	7	0	4	0	2	1
1	0	2	0	1	0	0	2	2	2	4	1
0	0	0	0	2	0	0	6	4	1	2	1

3.6 Índice de diversidade de Hunter e Gaston

O índice de diversidade de Hunter e Gaston (HGDI) da técnica MLVA foi calculado com a ferramenta *online* V-DICE considerando quatro painéis MLVA: 11 *loci* (Pinho *et al.*, 2012 e Spergser *et al.*, 2013), 9 *loci* (Spergser *et al.*, 2013), 8 *loci* (Pinho *et al.*, 2012) e 4 *loci* (Becker *et al.*, 2015) (MLVA-11, MLVA-8, MLVA-9 e MLVA-4). Também foram calculados os valores de diversidade de cada *locus* utilizado (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Poder discriminatório da técnica MLVA e dos *loci* utilizados.

Painel MLVA	Número de alelos	HGDI	IC 95 %
MLVA – 11 (este estudo)	55	0.989	0.979 - 0.999
MLVA – 8 (Pinho <i>et al.</i>, 2012)	47	0.978	0.962 - 0.994
MLVA – 9 (Spergser <i>et al.</i>, 2013)	47	0.978	0.961 - 0.994
MLVA – 4 (Becker <i>et al.</i>, 2015)	16	0.786	0.694 - 0.887
Locus			
MbovTR14	4 (0 - 3)	0.574	0.518 - 0.629
MbovTR29	7 (0 - 6)	0.664	0.593 - 0.735
MbovTR30	3 (0, 2, 3)	0.439	0.321 - 0.558
MbovTR31	6 (0, 2, 3, 5 - 7)	0.427	0.286 - 0.567
MbovTR35	4 (0, 1, 2, 4)	0.400	0.280 - 0.520
MbovTR40-41	6 (0 - 2, 5 - 7)	0.650	0.578 - 0.722
MbovTR52	5 (0, 2 - 4, 7)	0.377	0.242 - 0.512
MbovTR59	7 (0 - 6)	0.655	0.555 - 0.754
MbovTR147	5 (0 - 4)	0.442	0.306 - 0.578
MbovTR148	4 (0 - 3)	0.585	0.526 - 0.644
MbovTR427	7 (0 - 6)	0.777	0.726 - 0.828

Legenda: HGDI – Hunter and Gaston Diversity index. IC – Intervalo de confiança.

Painel de 8 *loci*: MbovTR14 a MbovTR59; Painel de 9 *loci*: MbovTR29 a MbovTR52 e MbovTR147 a MbovTR427; Painel de 4 *loci*: MbovTR30 a MbovTR35 e MbovTR52. Entre parênteses estão os alelos obtidos no presente estudo com base na Tabela 3.6.

Verificou-se que o painel MLVA-11 usado neste estudo foi o que apresentou maior diversidade, enquanto que com um painel de 4 *loci* a diversidade foi a menor observada. Dos 11 *loci* analisados e para a nossa amostragem de estirpes, os que demonstraram maior capacidade discriminatória foram, por ordem decrescente, os *loci* MbovTR427, MbovTR29, MbovTR59, MbovTR40-41, MbovTR148 e MbovTR14.

3.7 Análise de agrupamento das estirpes de *Mycoplasma bovis* deste estudo

Para a análise da relação genética dos perfis MLVA das estirpes estudadas, foi gerado um dendrograma (Figura 3.2) com base em 11 *loci*. Foi considerado o limite de corte a 55 % para a formação de *clusters*.

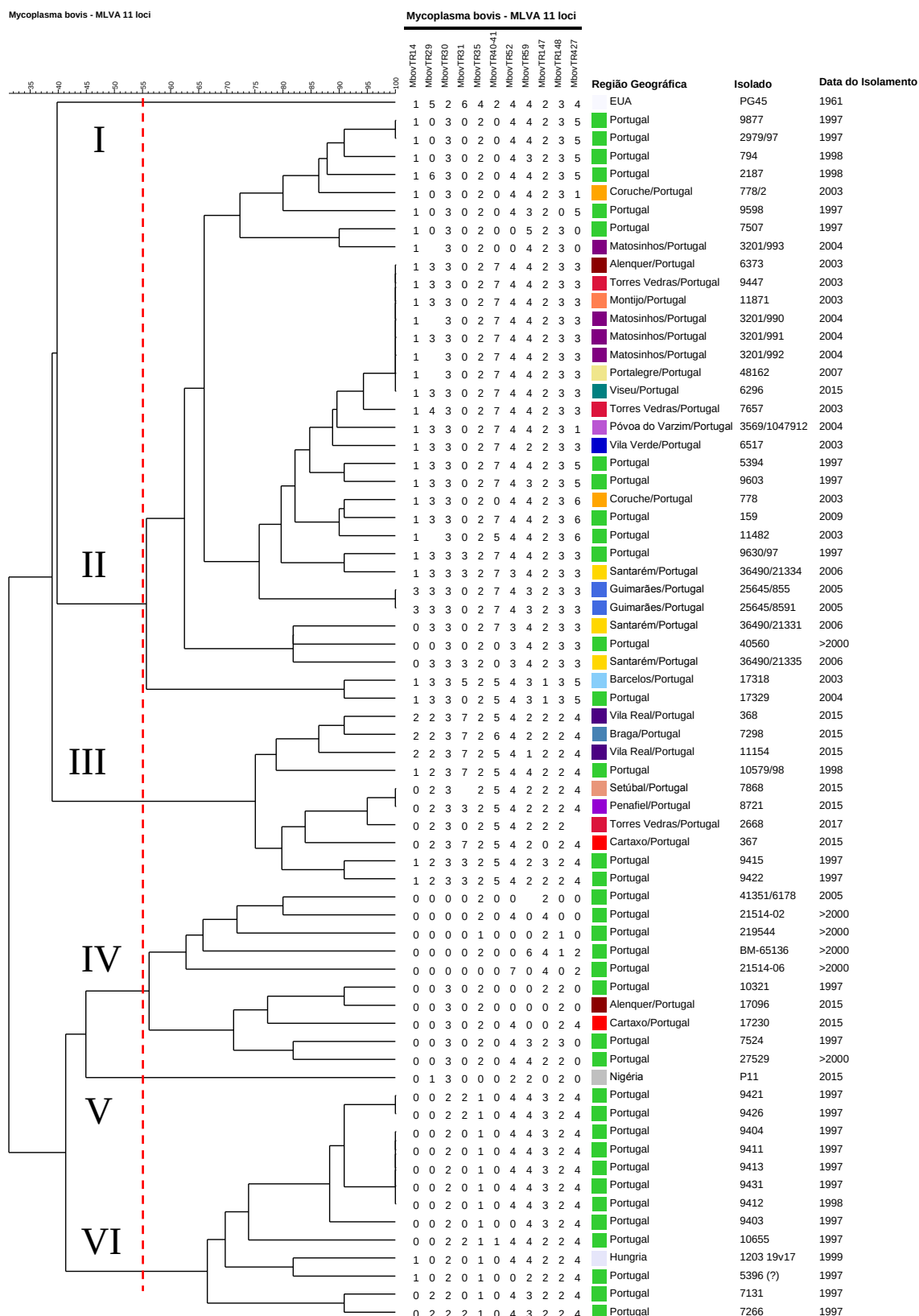


Figura 3.2 – Relações de semelhanças genéticas das 68 estirpes de *Mycoplasma bovis*, incluindo a estirpe tipo PG45^T, baseado em MLVA. O dendrograma foi construído usando o método aglomerativo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e coeficiente de semelhança categórico, com base em 11 loci. As cores que variam de roxo a azul representam regiões do norte do país e as cores que variam de amarelo a vermelho representam regiões de Lisboa e Vale do Tejo. A verde as regiões para as quais não se conseguiu obter a localização exacta em Portugal Continental e em cinzento as estirpes com origem na Hungria e Nigéria.

Verificou-se não existir relação entre a área geográfica de isolamento e o perfil MLVA sendo os perfis dispersos por todas as regiões. Também em relação ao ano de isolamento parece não haver uma atribuição específica de perfil MLVA por ano. No entanto, aparentemente, as estirpes isoladas nos anos 90 parecem agrupar-se predominantemente no *cluster* VI. Com base no critério estabelecido de limite de corte a 55% o *cluster* II, que inclui quatro *subclusters* agrupou o maior número de isolados. Um dos *subclusters* inclui estirpes isoladas de 2003 a 2015 no Norte e Centro de Portugal Continental com 100% de semelhança. Os *clusters* II, III e IV são mais homogêneos em termos de perfis e a estirpe Húngara inclui-se no *cluster* VI, apresentando grande similaridade com uma estirpe Portuguesa isolada em 1997. A estirpe da Nigéria forma um *cluster* à parte e exclusivo (*cluster* V), tal como acontece com a estirpe PG45^T, dos EUA (*cluster* I). Estes dados parecem indicar que, existem *clusters* associados aos continentes, pertencendo as estirpes da Europa, África e América do Norte a 3 *clusters* distintos. A confirmação desta observação carece da análise de maior número de estirpes dos continentes Africano e Americano.

3.8 Análise da relação de estirpes de *Mycoplasma bovis* por árvores de extensão mínima (MST)

Para a definição de complexos clonais de estirpes portuguesas de *Mycoplasma bovis* foi criada a árvore de extensão mínima baseada em 11 *loci* (Figura 3.3) considerando 65 estirpes portuguesas mais a estirpe tipo PG45^T. As áreas sombreadas indicam complexos clonais que são definidos com base na diferença máxima de um *locus* (ver 2.5.4).

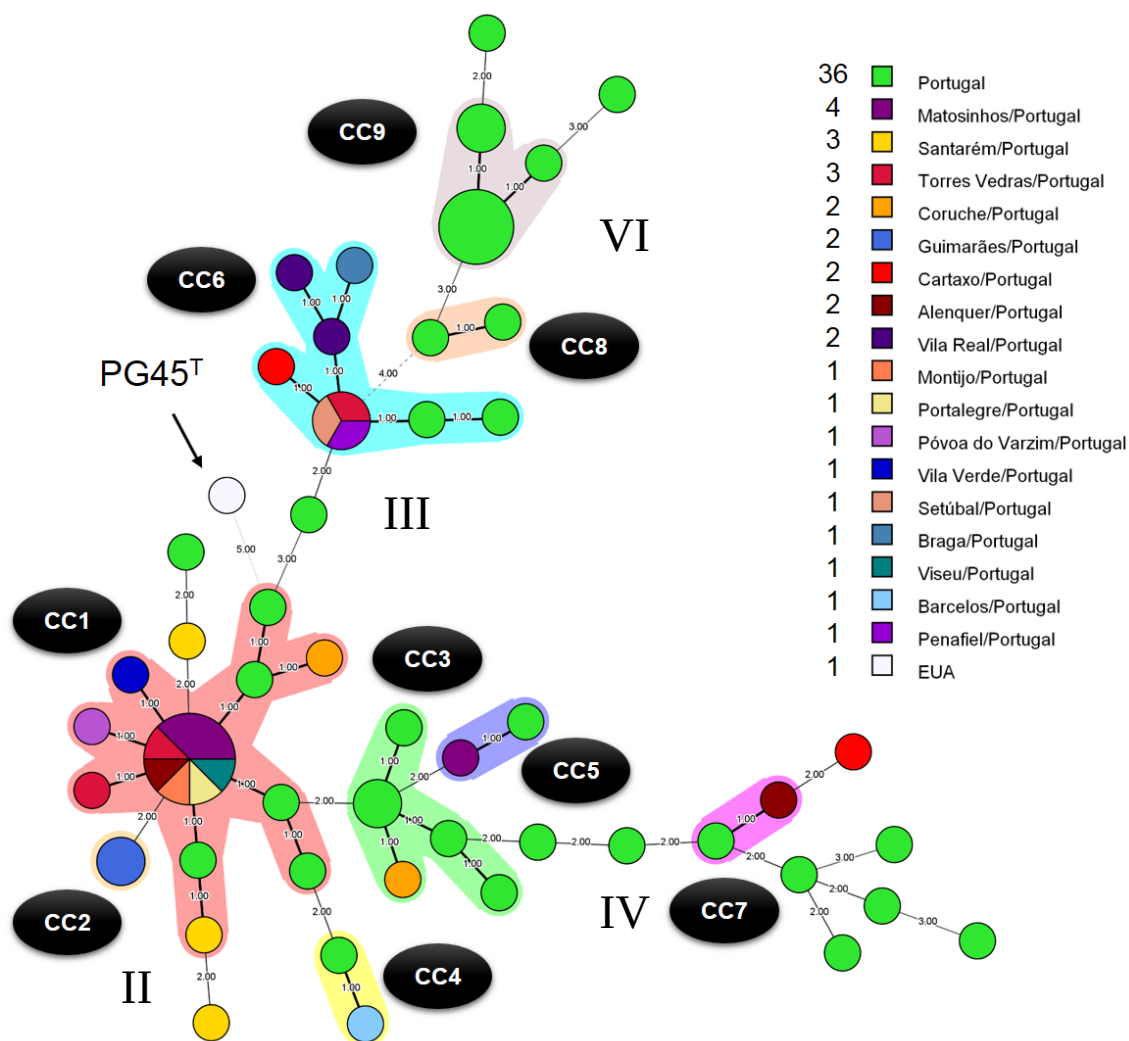


Figura 3.3 – Árvore de extensão mínima com base na análise de 11 *loci* para 65 estirpes de *Mycoplasma bovis* portuguesas. Foi utilizado o coeficiente categórico. As áreas sombreadas identificam complexos clonais (CC), numerados de 1 a 9, definidos com base na diferença máxima de um *locus*. São também mostrados os clusters II, III, IV e VI delineados na Figura 3.2. As cores que variam de roxo a azul representam regiões do norte do país e as cores que variam de amarelo a vermelho representam regiões de Lisboa e Vale do Tejo.

A relação clonal de 128 estirpes de *Mycoplasma bovis* europeias foi estudada também por árvore de extensão mínima, com base apenas em 8 *loci* (painel de Pinho *et al.*, 2012) para possibilitar a comparação de resultados. Os dados de MLVA analisados foram obtidos neste estudo e nos estudos de Pinho *et al.*, 2012 e Sulyok *et al.*, 2014 (Figura 3.4), sendo todas as estirpes de origem Europeia, com excepção da estirpe tipo PG45^T.

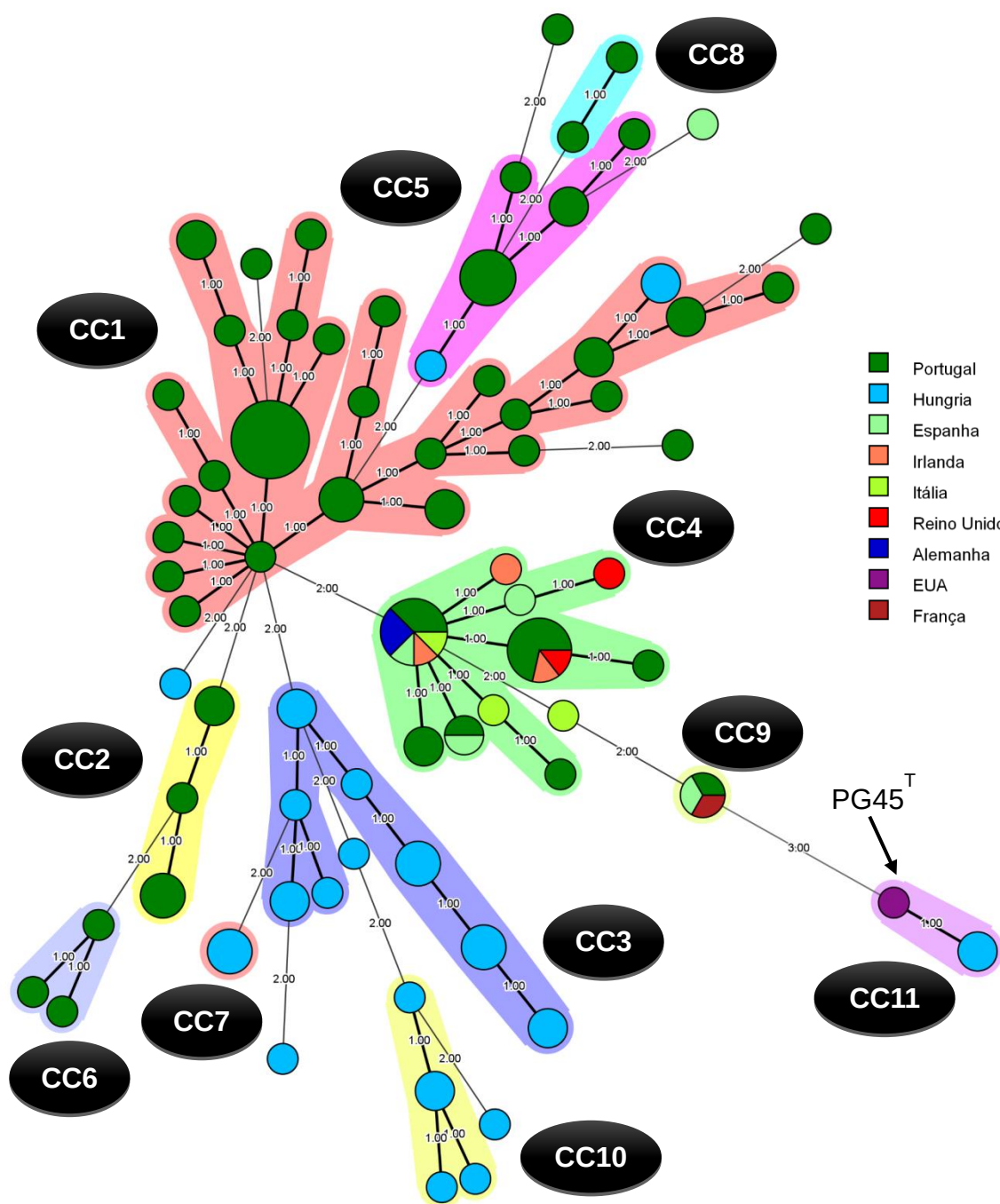


Figura 3.4 – Árvore de extensão mínima descrevendo as relações de 128 estirpes de *Mycoplasma bovis* de vários países europeus, incluindo a estirpe tipo PG45^T, com base em 8 *loci* (painel de Pinho *et al.*, 2012). Foi utilizado o coeficiente categórico. As áreas sombreadas identificam complexos clonais (CC), numerados de 1 a 11, definidos com base na diferença máxima de um *locus*.

Capítulo 4 – Discussão

Mycoplasma bovis é um agente patogénico com importância económica a nível mundial, pois está associado a casos de mastite, pneumonia, artrite, queratoconjuntivite, otite, meningite, infertilidade e aborto no gado bovino. Essas patologias levam a perdas de produção na indústria leiteira e na indústria de carnes, havendo quebras na produção do leite e redução do ganho de peso diário dos animais ^(13,21,22,29). Este microrganismo tem sido isolado e reportado em todo o Mundo e as várias patologias associadas têm um impacto económico importante na produção bovina ⁽²⁶⁾. Em Portugal poucos estudos têm sido feitos para tentar perceber qual a relevância deste agente, e a epidemiologia das doenças a ele associadas. Assim, 303 amostras de bovinos, suspeitos de tuberculose bovina foram analisadas para pesquisa de micoplasmas tendo sido obtidos nove isolados que foram identificados como *M. bovis* por provas bioquímicas e moleculares (PCR) (Tabela 3.1, Anexo A1).

A caracterização bioquímica foi conclusiva em todos os testes realizados para os isolados, não tendo sido obtidos resultados duvidosos. *Mycoplasma bovis* tem grande homologia com *Mycoplasma agalactiae*, agente etiológico da agalactia contagiosa dos pequenos ruminantes, não sendo possível distingui-los com base apenas em testes fenotípicos. Contudo, considerando que o hospedeiro é bovino, os resultados dos testes bioquímicos (Tabela 3.1 e Anexo A1) levam à suspeita de os isolados serem *M. bovis* e não *M. agalactiae*. Ainda assim, foi realizada a identificação molecular para a confirmação da espécie, tendo sido realizados os PCRs *Mbov* e *Mag2* específicos, respectivamente, para *M. bovis* e *M. agalactiae*, utilizando como controlos as estirpes tipo *M. bovis* PG45^T e *M. agalactiae* PG2^T. A extracção do DNA após quantificação revelou um rácio de pureza A260/280 acima de 1,8 para todos os isolados. Não foram detectados resultados falsos positivos em ambos os sistemas de PCR, tendo todos os nove isolados sido identificados como pertencentes ao género *Mycoplasma* e à espécie *Mycoplasma bovis* (Tabela 3.1).

O baixo número de isolados *M. bovis* obtidos (3%) era de esperar, visto que os animais foram abatidos por suspeita de tuberculose bovina com base nos resultados de prova da intradermotuberculinização de comparação (IDC). Para se ter uma noção da prevalência de *Mycoplasma bovis* teria de se ter delineada uma amostragem que permitisse a análise sistemática de explorações em todas as áreas do país.

A prevalência de 2,4 % foi calculada anteriormente para o período de 2007-2008 na região Noroeste de Portugal em explorações leiteiras, sendo este o único valor que se conhece para o país ⁽⁶⁵⁾. A nossa amostragem somente tornou possível o cálculo da frequência relativa de isolamentos. Com base na distribuição geográfica das amostras (Figura 3.1), considerando as Direcções de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais (DSAVR), despacho 10/G/2015 como limites geográficos, foram obtidas as frequências relativas que constam na Tabela 3.2.

Em Portugal continental a frequência relativa foi de 3,0 % com base em nove isolamentos em 300 amostras. Curiosamente parecem existir dois grandes focos dentro do espaço amostrado, nomeadamente para a DSAVR Norte e DSAVR Lisboa e Vale do Tejo. A região norte caracteristicamente apresenta explorações de produção leiteira e de pequenas dimensões (1 a 25 cabeças), enquanto que a região de Lisboa e Vale do Tejo apresenta explorações essencialmente de produção de carne, de dimensões pequenas (DAV Oeste) a médias (DAV Setúbal e DAV Ribatejo). Com base na análise dos dados referentes às estirpes pertencentes ao biobanco do INIAV, verificou-se que isolamentos esporádicos de *M. bovis* foram obtidos ao longo de 2002 a 2009 (Tabela 3.5 e dados não mostrados), após erradicação da PPCB ^(33,52). Neste período verificou-se que a frequência de isolamentos de *M. bovis* foi maior na região de Entre Douro e Minho (EDM), sendo obtidos também alguns isolamentos nas regiões de Trás-os-Montes, Lisboa e Vale do Tejo e Beira Litoral.

As observações macroscópicas associadas à broncopneumonia causada por *Mycoplasma bovis* envolvem a formação de lesões caseonecróticas, que são muitas vezes confundidas com as lesões causadas por *Mycobacterium bovis* ⁽¹³⁾. Uma vez que as amostras são pertencentes a suspeitas de Tuberculose bovina (TB) foi calculada a frequência relativa de co-infecção entre *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium bovis*, por serem conhecidos os valores de isolamento para os dois casos (Tabela 3.3 e Figura 3.1b). A amostragem enviesada não permite, todavia, saber se há sinergia ou uma relação antagónica entre as duas bactérias no processo de infecção em pneumonias de bovinos.

Para os nove isolados obtidos verifica-se que existem duas co-infecções, representando 22,2 % entre os nove isolados e 0,7 % para o total de amostras analisadas (n=303). Os dados da anatomopatologia nas co-infecções registadas, 368 e 7298 (duas fêmeas, jovem e adulta), não se encontram disponíveis, o que não permite associar as lesões ao tipo de pneumonia presente (TB e BRDC), podendo então os animais ter tido uma doença, as duas doenças, ou apenas serem portadores de ambos os microorganismos, isto é, estado subclínico de infecção onde se verifica a baixa patogenicidade do microorganismo ou estádios iniciais de uma possível infecção ⁽²⁷⁾. A nível de distribuição geográfica as co-infecções, que surgem na região Norte do país, apresentam uma distância aproximada em linha recta de cerca de 90 km de distância e representam cerca de 3,3 % de co-infecções dentro das amostras analisadas da DSAVR Norte (n=60). A TB apresenta maior risco em adultos, pois a exposição aumenta com a idade sendo a expressão clínica da doença geralmente em idades mais avançadas. Quanto ao género, o assunto é controverso, suspeitando-se que os casos em que há desvios do rácio sexual estejam ligados às práticas de gestão que favorecem a permanência dos animais por períodos prolongados, aumentando a exposição ao microorganismo ⁽⁶⁶⁾.

Para a amostra 367, a informação de anatomopatologia não está disponível, o que não permite saber o estado clínico em que o animal se encontrava. Também não foi verificada a co-infecção, no entanto, a nível de exploração para as outras três amostras desta exploração foram verificados três casos de isolamento de *Mycobacterium bovis*. A coexistência dos dois

microorganismos dentro de uma mesma exploração pode indicar que mais animais possam ter um ou os dois microorganismos o que apresenta risco para a exploração em causa na contracção de TB e BRDC.

Para a amostra 8721, a anatomopatologia revela que não existem lesões, o que sugere que o bovino em questão era portador de *Mycoplasma bovis*.

Para a amostra 11154, a informação de anatomopatologia não está disponível, o que não permite saber o estado clínico em que o animal se encontrava.

Para as amostras 6296 e 7868 a anatomopatologia releva que há sinais de pneumonia arrastada e lesões de bronquite crónica. Este quadro clínico sugere que tenha ocorrido uma infecção viral seguida de infecção bacteriana, que poderá estar associada com *Mycoplasma bovis* ^(20,27). Para as amostras 17096 e 17230 a anatomopatologia revela que há lesões de pneumonia granulomatosa, que são lesões mais frequentemente associadas a *Mycobacterium bovis*, no entanto não foram verificados isolamentos desta bactéria nestas amostras, mas sim de *Mycoplasma bovis* o que sugere que estes dois animais também apresentavam indícios de BRDC e não só de TB.

Como já referido, em Portugal casos de isolamentos esporádicos de *M. bovis* foram obtidos ao longo de vários anos. O baixo número de isolamentos ao longo dos últimos anos, ainda nos dias de hoje, deve-se essencialmente à falta da consciencialização dos veterinários de campo e agricultores, que resultam em muito poucos pedidos para o diagnóstico laboratorial específico. De modo a conhecer o panorama nos últimos 20 anos no que diz respeito à disseminação e dinâmica populacional (diversidade e relação com os hospedeiros) de *M. bovis* em Portugal e na europa, foi utilizada a técnica de MLVA para a tipificação de isolados portugueses.

Dos cerca de 168 isolados de *Mycoplasma bovis* pertencentes ao biobanco do INIAV, I.P., foi apenas possível a obtenção de 58 isolados em cultura. A falta de crescimento dos outros isolados em meio de cultura, infelizmente revelou a inviabilidade que impossibilitou a obtenção de mais isolados para a tipificação por MLVA. Deste modo, foram utilizados 68 isolados, incluindo a estirpe tipo PG45^T e novos isolados obtidos de amostras suspeitas de TB, na aplicação da técnica MLVA. Estes isolados pertencem maioritariamente à região norte e centro, mais precisamente Entre Douro e Minho (EDM) e Beira litoral (BL), no entanto, não é possível saber a região geográfica especificamente para alguns dos isolados (Tabela 3.5). Os micoplasmas previamente isolados foram re-caracterizados por testes bioquímicos e PCR de modo a evidenciar a correcta atribuição à espécie *M. bovis*. A extracção do DNA após quantificação revelou um rácio de pureza A260/280 acima de 1,8 para todos os isolados. Os resultados de testes bioquímicos foram inconclusivos somente para o isolado 3201/993, mas por PCR o isolado foi classificado como pertencente a *M. bovis*.

Em 2012, Pinho *et al.*, 2012 descrevem uma primeira abordagem da aplicação da técnica de MLVA em *Mycoplasma bovis*. Esta mais tarde em 2013 foi revista e alterada por Spengler *et al.*, 2013. No total dos dois estudos são considerados 12 *loci* que foram estudados

no presente estudo ^(52,53). Estes *loci* são considerados como minissatélites pois as unidades de repetição oscilam entre 39 pb e 138 pb (Tabela 3.4) ⁽⁵⁸⁾.

Para o cálculo do número de cópias é necessário saber os valores, em pares de base, correspondentes a cada fragmento de amplificação teórico, unidade de repetição e valor de sequências flanqueadoras, havendo extrapolação directa do número de cópias e dimensões dos fragmentos (ver métodos 2.5.1 e 2.5.2). Tanto em Pinho *et al.*, 2012 como em Spargser *et al.*, 2013, não é referido o valor de cada fragmento de amplificação associado a um valor de número de cópias da unidade de repetição, valores das sequências flanqueadoras, nem padrões de consenso associados às unidades de repetição, o que dificulta a rápida implementação e comparação de resultados ^(52,53).

De forma a conhecer os valores, em pares de base, associados a cada fragmento de amplificação, foi realizada a análise *in silico* no programa Tandem Repeats Finder (TRF), estando as informações disponíveis na Tabela 3.4 e Anexo A2. A análise realizada no programa TRF foi apenas realizada na estirpe tipo PG45^T por se ter verificado por via da ferramenta online “Nucleotide BLAST”, que para outros genomas de *Mycoplasma bovis* sequenciados (estirpes chinesas), as zonas de hibridação dos *primers* não eram compatíveis com a análise PCR, isto é, a não hibridação de *primers*, hibridação de *primers* no mesmo sentido ou produtos de amplificação teóricos muito longos (maiores que 27 Kb – dados não mostrados).

Para conhecer o valor das sequências flanqueadoras é necessário conhecer a posição de hibridação dos *primers* no genoma, tal como a posição no genoma onde surge o padrão de consenso repetido em tandem. A repetição em tandem, no entanto pode não ser completa, sendo os alelos obtidos considerados como incompletos, algo que se verifica no genoma da estirpe tipo de *M. bovis* (Anexo A2).

Foram também obtidas informações relativamente aos *loci* analisados, pois houve uma re-anotação do genoma da estirpe tipo (Tabela 3.4). Tanto em Pinho *et al.*, 2012 como em Spargser *et al.*, 2013, são referidas funções de proteína putativa para os vários *loci*. Excepto MbovTR59 (antigo *locus* MBOVPG45_0572) e MbovTR427 (antigo *locus* MBOVPG45_0427) que codificam para proteínas hipotéticas e para MbovTR29 que se encontra numa região intergénica não codificante, todos os outros são pseudogenes. A presença de pseudogenes numa análise MLVA é valiosa pois apesar de não serem conhecidas de modo claro as funções que estes desempenham, são zonas do genoma que sofrem mutações mais frequentemente do que genes que são expressos, pois estão menos sujeitos à pressão selectiva, ou seja, é expectável que mostrem maior diversidade ^(47,50,57,58).

De todos os *loci* analisados apenas o *locus* MbovTR49-51 foi o único onde foi obtido um padrão de multibanda em todos os isolados de campo, mesmo após a tentativa de optimização das condições de PCR no que respeita à temperatura de hibridação e mistura de reacção relativamente às concentrações de MgCl₂. Igualmente em Spargser *et al.*, 2013 para este *locus* foi verificado o padrão de multibanda (referido como TR49-50) ⁽⁵³⁾. Este *locus* foi descartado na análise de dados por não ser informativo.

Durante o processo de standardização foi verificado que o perfil da estirpe tipo utilizada não correspondia ao publicado pelos vários autores. O perfil obtido foi 2.2-**1.8-3.3-0.0-2.5-8.0-4.0-1.0-2.0-1.0-3.5** (MbovTR14-MbovTR29-MbovTR30-MbovTR31-MbovTR35-MbovTR40-41-MbovTR52-MbovTR59-MbovTR147-MbovTR148-MbovTR427) e não 2.2-4.8-2.3-5.8-4.0-4.0-4.0-2.4-2.0-2.0-3.5. Esta estirpe foi utilizada na mesma como referência, excepto para o *locus* onde o alelo foi nulo. Para MbovTR31 foi utilizado o isolado 7298. Para a análise de dados foi apenas considerado o perfil de PG45^T publicado, por fazer mais sentido para a análise ^(52,53).

A aplicação da técnica MLVA em estirpes de *M. bovis* do presente estudo, com base nos *loci* propostos por Pinho *et al.*, 2012 e Spersger *et al.*, 2013, apresentou um grande valor de alelos nulos (Figura 3.2, Tabela 3.5 e Tabela 3.7). A maior quantidade de alelos nulos ocorre em MbovTR14 com 29, MbovTR29 com 28, MbovTR40-41 com 34 e MbovTR31 com 50. Nos outros *loci* foram obtidos valores entre 2 e 10 alelos nulos. Para estes 4 *loci* os grandes valores de alelos nulos podem indicar que se tratam de falsos negativos, fraco desenvolvimento dos *primers* por parte de Pinho *et al.*, 2012 e é indicador de que as sequências flanqueadoras têm um baixo grau de conservação. No anexo A2 é possível observar que para MbovTR14, MbovTR29, MbovTR31 e MbovTR40-41 as sequências flanqueadoras são muito grandes. As recomendações de Nadon *et al.*, 2013 apontam para uma hibridação dos *primers* a 40 nucleótidos das zonas que ladeiam a repetição em tandem, no entanto, a percentagem de G+C de 29,3% de *M. bovis* dificulta o desenvolvimento de *primers* de um modo a que a análise possa ser correntemente feita por meio de gel de agarose ⁽⁵⁹⁾. Outra possível causa é a falta de uma estirpe europeia sequenciada, de preferência isolada de um caso de pneumonia, visto que parece existir diferenciação de estirpes de mastite e estirpes de pneumonia ⁽⁵⁶⁾. A análise *in silico* de facto revela que a estirpe tipo (isolada de leite) e as estirpes chinesas (isoladas de pulmões) apresentam diferenças nestes *loci*, algo que também poderá acontecer em algumas estirpes europeias que estão associadas a BRDC (dados não mostrados).

Em Pinho *et al.*, 2012, Sulyok *et al.*, 2014 e Becker *et al.*, 2015 para o *locus* MbovTR31 existe o mesmo problema, que ocorre essencialmente em estirpes isoladas depois do ano 2000 ^(52,54,55). Becker *et al.*, 2015 desenvolveram um novo *primer reverse* que hibrida 170 nucleótidos a montante do *primer* desenvolvido por Pinho *et al.*, 2012 (Anexo A2), estando este mais perto da repetição tandem. Com este *primer* obtiveram bons resultados, tendo o valor de alelos nulos baixado de 45 para 6, mas estes revelaram um padrão de consenso diferente do de PG45^T. No presente estudo não foi possível realizar o estudo com este novo *primer reverse* devido aos custos e envolvidos na análise.

Apesar do grande número de alelos nulos nos *loci* MbovTR14, MbovTR29, MbovTR40-41 e MbovTR31, estes foram considerados no estudo por apresentarem uma diversidade que permite diferenciar os isolados tipificados (Tabela 3.8).

O índice de diversidade de Hunter e Gaston (HGDI) mede a possibilidade de distinção de estirpes não relacionadas, ou seja, a probabilidade de duas estirpes pertencerem a grupos diferentes. O HGDI pode também ser utilizado para comparar painéis de tipificação de modo a

obter o sistema mais discriminatório possível. O cálculo é baseado no número de tipos criados e na frequência de ocorrência desses tipos ⁽⁵¹⁾.

A Tabela 3.8 mostra as relações de diversidade obtidas para cada painel considerado, tal como a diversidade obtida para cada *locus*. Para o valor dos *loci* a nível individual, o número de polimorfismos variou entre 3 e 7. Verifica-se que o *locus* menos discriminatório foi MbovTR52, HGDI de 0,337 [IC 95 %: 0,242 – 0,512] e o mais discriminatório MbovTR427, HGDI de 0,777 [IC 95 %: 0,726 – 0,828].

Apesar da baixa diversidade obtida em cada *locus*, a combinação dos 11 *loci* em conjunto mostrou uma grande diversidade. Para o painel de 11 *loci* considerado no estudo foram obtidos 55 perfis de MLVA e a diversidade obtida foi de 0,989 [IC 95 %: 0,979-0,999]. O valor próximo de 1 que indica que a técnica de MLVA em *Mycoplasma bovis* com os 11 *loci* utilizados, demonstra ser uma boa técnica para a tipificação de isolados, apresentando um grande poder discriminatório ⁽⁴⁶⁾.

Para o painel de Pinho *et al.*, 2012 e para o painel de Spargser *et al.*, 2013, são obtidos 47 perfis MLVA para uma diversidade de 0,978. Apesar dos painéis se revelarem bons para uma análise MLVA, o painel de 11 *loci* tem um maior poder discriminante por avaliar mais polimorfismos o que permite conhecer melhor as relações entre estirpes ⁽⁵⁷⁾. Relativamente ao painel de Becker *et al.*, 2015 onde são usados 4 *loci* é notória a baixa diversidade, 0,786 de HGDI, que correspondem aos *loci* com a menor diversidade deste estudo. Este valor de HGDI é igual ao obtido por Becker *et al.*, 2015 (0,786) e está abaixo do valor considerado como bom de 0,90 para um bom painel de tipificação ⁽⁵¹⁾.

Por recolha de dados dos perfis MLVA obtidos no presente estudo, Pinho *et al.*, 2012, Sulyok *et al.*, 2014 e Becker *et al.*, 2015, foi possível a obtenção da Tabela 3.6, que faz a correspondência da dimensão dos fragmentos obtidos com o número de cópias em tandem ^(52,54,55). A Tabela 3.6 tem a função de permitir a comparação entre todas as estirpes de um modo global para a posterior avaliação de complexos clonais existentes na europa. A nomenclatura dos VNTRs como, designação_tamanho da repetição(pb)_fragmento correspondente(pb)_número de cópias(u) foi adoptada de Nadon *et al.*, 2013, tendo sido mantidas as designações dos vários “MbovTR” por já terem sido publicadas anteriormente com esta designação ⁽⁵⁹⁾.

Foram encontrados 14 alelos que nunca foram observados anteriormente, dos quais se destacam oito alelos intermédios para MbovTR31 (2), MbovTR35 (1), MbovTR59 (2) e MbovTR427 (3). Os alelos encontrados são considerados intermédios por não ser um valor correspondente a uma unidade de repetição completa esperada. Para os alelos encontrados (4,0 e 5,0) em MbovTR31 parece haver a deleção da unidade de repetição incompleta que tem um valor de 78 pb e não de uma unidade completa que tem valor de 102 pb (Anexo A2). A visualização em gel de agarose mostra que inequivocamente são alelos diferentes de 3,8 e 6,8 (alelos mais próximos encontrados nos isolados) pois a migração dos fragmentos de amplificação é diferente (dados não mostrados). No entanto, não foi possível realizar a

confirmação por sequenciação até à presente data para nenhum dos alelos intermédios encontrados neste estudo.

O caso de MbovTR427 é semelhante ao caso anterior sendo que a unidade de repetição incompleta tem um valor de 48 pb e a unidade de repetição completa um valor de 108 pb (Anexo A2).

Em MbovTR35, foi encontrado um alelo correspondente a 176 pb. Becker *et al.*, 2015, também reportam um alelo da mesma dimensão, que após a sequenciação revela que não existe um padrão de repetição. Este alelo é encontrado apenas em estirpes recentes de depois do ano de 2000 ⁽⁵⁴⁾. Para os isolados do presente estudo o alelo de 176 pb é encontrado em estirpes de 1997 a 2017 (Tabela 3.5). Desconhece-se se se trata do mesmo alelo e como tal, não é possível tirar ilações no que diz respeito à origem deste alelo.

MbovTR59 teve dois alelos intermédios, um deles apresenta a mesma situação de MbovTR31 e MbovTR427, sendo a unidade de repetição intermédia de 61 pb (Anexo A2) e a unidade de repetição completa de 138 pb. O outro alelo mostrou um valor aproximado de 600 pb em gel de agarose, tendo mais 34 pb do que o alelo 3,4 (566 pb) e menos 104 pb que o alelo teórico 4,4 (704 pb).

Foi assumido que as deleções correspondem às repetições intermédias devido à migração verificada em gel de agarose em conjunto com os marcadores moleculares adequados.

Para a análise de dados, uma vez que não foram sequenciados os fragmentos de amplificação dos diversos *loci* encontrados neste estudo, que são claramente distintos dos fragmentos de amplificação mais próximos, isto é, uma repetição acima e uma repetição abaixo, foi adoptada a estratégia de codificação de dados com base na dimensão do fragmento de amplificação e não no número do valor da repetição (Tabela 3.6), pois apenas a sequenciação dos novos alelos encontrados neste estudo permitiria esclarecer o seu número exacto de repetições em tandem. Com base neste critério de codificação, foram obtidos 55 perfis diferentes (Tabela 3.7) sendo predominante o perfil 00201044324 (MbovTR14-MbovTR29-MbovTR30-MbovTR31-MbovTR35-MbovTR40-41-MbovTR52-MbovTR59-MbovTR147-MbovTR148-MbovTR427) correspondente a cinco estirpes.

O dendrograma das relações de semelhança genéticas mostra que para um limite de corte a 55 % as estirpes portuguesas de *M. bovis* são agrupadas em quatro *clusters* (Figura 3.2). O *cluster* II agrupa 33 estirpes que compreendem os anos de 1997-2015, sendo a grande maioria estirpes de anos depois do ano 2000 e apresenta uma grande abrangência geográfica a nível de país. Neste *cluster* é encontrada a estirpe 6296 (DSAVR Centro) de 2015.

O *cluster* III agrupa 10 estirpes e compreende os anos 1997-2017, sendo a grande maioria as estirpes de 2015, das quais duas pertencem à DSAVR Lisboa e Vale do Tejo e quatro à DSAVR Norte. Neste *cluster* são agrupadas as estirpes onde foi encontrada co-infecção com *Mycobacterium bovis*. Tal como no *cluster* II existe uma grande abrangência geográfica a nível de país.

O *cluster* IV agrupa 10 estirpes que compreendem os anos de 1997-2015, sendo a maioria das estirpes de anos depois de 2000. Neste *cluster* são agrupadas as estirpes 17096 e 17230 (DSAVR LVT).

O *cluster* VI agrupa 13 estirpes que compreendem os anos de 1997-1999, sendo a grande maioria de 1997. Neste *cluster* é também agrupada a estirpe da Hungria.

A estirpe tipo PG45^T e a estirpe nigeriana P11 formaram cada uma, linhas simples, mostrando que estão claramente afastadas das estirpes portuguesas, *clusters* I e V, respectivamente.

A formação de quatro *clusters* a 55 % de semelhança revela que as estirpes de *Mycoplasma bovis* poderão ter 4 origens diferentes. A grande maioria dos isolados tipificados por MLVA terá origem nas regiões do norte do país, pois estes isolados foram obtidos essencialmente durante o período de vigilância de PPCB. A região norte do país é conhecida por apresentar o maior número de explorações, sendo que estas são de dimensão pequena. A juntar a isto, a possibilidade facilitada das transações de gado assintomático como já sugerido por Pinho *et al.*, 2012, contribui para uma grande diversidade de estirpes de *M. bovis* ⁽⁵²⁾.

Foi também construída uma árvore de extensão mínima (MST) para mostrar as relações dos perfis MLVA (Figura 3.3) na formação de complexos clonais (CC). Tal como no dendrograma verifica-se que não existe uma relação específica com a região de isolamento. Verifica-se também que há uma grande diversidade nas estirpes de *M. bovis* portuguesas, onde se observa a formação de nove CC. Ao *cluster* II correspondem os CC1 a CC5, o que mostra que este *cluster* foi o mais heterogéneo. No CC1 encontra-se a estirpe 6296 de 2015. Curiosamente verifica-se que a nível de exploração e também de região são verificadas linhagens diferentes, algo também verificado por Sulyok *et al.*, 2014 em estirpes húngaras ⁽⁵⁵⁾. As estirpes 778 e 778/2 pertencem a complexos clonais diferentes (CC1 e CC3), o mesmo se verifica com as estirpes 36490/21331, 36490/21334 e 36490/21335 que possuem aparentemente origens diferentes. Também se verifica nas estirpes 3201/990, 3201/991, 3201/992 e 3201/993, as três primeiras pertencem ao mesmo CC1, mas a última pertence ao CC4. Para o caso de 3201/993, o agrupamento disjunto é congruente com os resultados obtidos nos testes bioquímicos. Para as estirpes isoladas em 2015 um caso a nível de região (Cartaxo) verifica-se em 367 e 17230, que se encontram no CC6 e CC7 (*clusters* diferentes), respectivamente. O único caso em que estirpes pertencentes à mesma exploração não agrupam de maneira diferente é o caso das estirpes de Guimarães, 25645/8591 e 25645/855, CC4. As possíveis causas que podem ser apontadas têm a ver com o tipo de gestão que é praticado na exploração na introdução de novo gado, isto é, se o regime é fechado considera-se que o gado provém de uma única fonte e se é aberto o gado introduzido provém de fontes diferentes ao longo do tempo. Este último caso pode representar surtos/focos onde surgem estirpes diferentes ⁽⁶⁷⁾.

Ao *cluster* III corresponde o CC6 onde se encontram sete estirpes mais recentes (2015-2017). Ao *cluster* IV corresponde o CC7 onde se encontra a estirpe 17096. 17230 não forma CC. O *cluster* VI tem os CC8 e CC9 ambas pertencentes a estirpes de 1997.

Excepto para o CC2 e CC4 (ambos da região norte), em todos os CC são encontradas estirpes de 1997, o que sugere que nas estirpes portuguesas exista diversidade de origem múltipla, que se tem mantido até aos dias de hoje. Esta diversidade apresenta-se a nível de país, não havendo regionalização, nem restrição anual aparentemente. Um grande exemplo disso encontra-se no cluster II mais especificamente no CC1, onde são encontradas estirpes pertencentes a várias regiões de Portugal de anos 2003-2015 formando um grupo central e onde estão também estirpes de 1997 relacionadas neste CC. Também para as estirpes isoladas neste estudo em que a grande maioria pertence ao CC6, *cluster* III, verifica-se que não há regionalização nem relação temporal, pois são também encontradas estirpes de 1997.

Para as estirpes de 2015 que foram isoladas de regiões diferentes e que pertencem a três CCs e *clusters* diferentes, para uma percentagem de 55 % de semelhança, tal é indicador de que tenham possíveis origens diferentes (Figura 3.2 e 3.3). Esta diversidade pode ser explicada pela grande movimentação do gado ao longo dos anos no país ⁽⁵²⁾.

De modo a avaliar a formação de CC de *M. bovis* na Europa foi gerada uma MST para estirpes europeias contendo estirpes do presente estudo e dos estudos de Pinho *et al.*, 2012 e Sulyok *et al.*, 2014 (Figura 3.4). Para esta árvore são apenas considerados os *loci* comuns aos três estudos, isto é, painel de Pinho *et al.*, 2012 sem o *locus* MbovTR49-51 (8 *loci* no total).

O nó mais central da árvore é uma estirpe portuguesa de 2003, 11482. A MST europeia mostra que as estirpes húngaras apresentam um grupo distinto das estirpes portuguesas deste estudo e do estudo de Pinho *et al.*, 2012, o que mostra que há diversidade geográfica entre os dois países. A maioria das estirpes de Pinho *et al.*, 2012 mostrou-se também num grupo à parte, estando as estirpes portuguesas separadas por duas diferenças, com as estirpes estudadas neste estudo. No que toca a CC só para estirpes portuguesas existem sete e nas estirpes húngaras existem seis, o que reforça a ideia de que as estirpes portuguesas e húngaras apresentam de facto uma grande diversidade, com origens múltiplas ^(52,55). Este comportamento de *M. bovis* também já foi relatado em estirpes chinesas, havendo variação dentro da mesma província (Hubei-1 e HB0801, ambas isoladas em 2008), demonstrando que o microorganismo é bastante plástico ⁽¹⁶⁾.

Se por um lado há estirpes portuguesas e estirpes húngaras que formam vários CC distintos, mostrado diversidade intra-país, por outro lado verifica-se que parecem existir fontes comuns na Europa de onde surgem estirpes de *M. bovis*. No entanto, este último caso verifica-se essencialmente para as estirpes do estudo de Pinho *et al.*, 2012, tendo sido sugerida a hipótese da movimentação do gado dentro da comunidade europeia como a causa principal ⁽⁵²⁾.

Da MST europeia obtêm-se também algumas relações entre estirpes de outros estudos com as deste estudo. Dos sete complexos clonais de estirpes portuguesas, as estirpes formaram os CCs, CC1, CC2, CC5, CC6 e CC8. A perda dos CC comparativamente com a MST portuguesa (Figura 3.3), está relacionada com o menor número de *loci* analisados.

Assim, verifica-se a proximidade com quatro estirpes, estado duas estirpes húngaras dentro do CC1, MYC48 (Ősi – 2012) e MYC2 (Püspökhátvan - 2011), próximas das estirpes

17096 (Alenquer - 2015) e 10321 (1997). Outras estirpes próximas, com duas diferenças, das deste estudo são MYC80 (Ebes - 2011) também da Hungria próxima de 11482 e 033M (2004) de Espanha próxima de 9426 e 9421 (1997). Observa-se ainda que o isolado húngaro do biobanco do INIAV, IP., está dentro do CC5. O agrupamento destas estirpes próximas ou dentro de CC portugueses revela que as movimentações do gado na europa poderão ter alguma influência na disseminação de *M. bovis* e possíveis relações epidemiológicas entre Portugal e europa.

Aos CC2 e CC6 correspondem as estirpes do *cluster* III (Figura 3.2), não tendo sido verificado nenhum agrupamento de estirpes europeias. Estes resultados sugerem que se tratam de estirpes com origem portuguesa, mas, no entanto, será necessário alargar o estudo quer dentro do país quer a mais países europeus, de modo a conhecer a verdadeira origem das estirpes de 2015-2017 de *M. bovis* em Portugal.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas Futuras

Mycoplasma bovis é um agente patogénico que tem ganho relevância nos últimos anos após a erradicação da PPCB, causada por *Mycoplasma micoides* subsp. *micoides*. De modo a conhecer a diversidade e origem de isolados de *M. bovis* portugueses, neste estudo foram analisadas amostras *post mortem* de bovinos e foram tipificados isolados de *M. bovis*.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Dos nove isolados obtidos nas amostras de suspeitas de tuberculose bovina verificam-se dois focos regionais, DSAVR Norte e DSAVR Lisboa e Vale do Tejo.
- Os tipos de lesões encontradas na anatomopatologia revelam que a maioria dos isolados estava relacionado com lesões de pneumonia.
- Nos 67 isolados tipificados foram encontrados 14 novos alelos.
- Apesar do grande valor de alelos nulos obtidos, o poder discriminante da técnica MLVA em *M. bovis* com 11 *loci* foi muito grande, apresentando um índice de diversidade de 0,989. Foram formados 55 perfis MLVA, tendo cada *locus* variado entre 3 e 7 no número de alelos.
- A análise do dendrograma revela que são formados seis *clusters*, dos quais quatro são de estirpes portuguesas e a árvore de extensão mínima portuguesa mostra que são formados nove complexos clonais. O que mostra que existe uma grande diversidade e origens múltiplas nas estirpes de *M. bovis* portuguesas nos últimos 20 anos.
- A presença de estirpes da América do Norte, África e Europa em *clusters* diferentes sugere que existam diferenças a nível continental.
- Não foi verificada relação geográfica nem temporal a nível de região dentro de Portugal, sendo a causa provável deste acontecimento a facilidade da movimentação do gado.
- Dentro de uma mesma exploração ou região, é observada diversidade clonal. A explicação mais provável aponta para que as práticas de gestão em regime aberto potenciem a introdução numa exploração de animais de fontes diferentes ao longo dos anos.
- A árvore de extensão mínima europeia mostra que as estirpes deste estudo e estirpes húngaras possuem origens múltiplas a nível de país. Por outro lado, também há estirpes portuguesas que apresentam a mesma linhagem que outras estirpes europeias.

Os isolamentos esporádicos que se verificam ao longo dos anos devem-se à falta de consciencialização dos veterinários de campo e agricultores, que resultam em muito poucos pedidos para o diagnóstico laboratorial. É necessário que mais análises sejam submetidas de modo a que seja conhecido o panorama real da BRDC em Portugal.

Apesar do painel MLVA em *Mycoplasma bovis* se ter revelado muito bom é necessário o desenvolvimento de *loci* com repetições microssatélite (< 9 pb) pois estas apresentam maior variabilidade na maioria dos casos.

Seria também interessante a tipificação por um método baseado em sequenciação, por exemplo MLST, que permite estabelecer as relações filogenéticas com base em *loci* que são menos sujeitos à pressão selectiva e tentar perceber se as relações encontradas neste estudo são mantidas.

É também necessário que sejam desenvolvidos esforços para a caracterização de estirpes resistentes e multirresistentes a antibióticos de modo a melhorar a eficácia dos tratamentos.

De modo a possibilitar a erradicação da BRDC é necessário que seja desenvolvida uma vacina eficaz contra *M. bovis*, pois este é o único agente patogénico da BRDC para o qual ainda não existe uma vacina eficaz.

Bibliografia

1. Krass, C. J., & Gardner, M. W. (1973). **Etymology of the term Mycoplasma.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(1), 62-64.
2. Brown, D. R., May, M., Bradbury, J. M., Balish, M. F., Calcutt, M. J., Glass, J. I., Tasker, S., Messick, J. B., Johansson, K.-E. and Neimark, H. 2015. **Mycoplasma.** Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–71.
3. Brown, D. R., May, M., Bradbury, J. M. and Johansson, K.-E. 2015. **Mollicutes.** Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–8.
4. May, M., Balish, M. F., & Blanchard, A. (2014). **The Order Mycoplasmatales.** In *The Prokaryotes* (pp. 515-550). Springer Berlin Heidelberg.
5. EUZEBY (J.P.): **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47, 590-592.
6. Brown, D. R., Whitcomb, R. F., & Bradbury, J. M. (2007). **Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes).** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(11), 2703-2719.
7. Woese, C. R., Maniloff, J., & Zablen, L. B. (1980). **Phylogenetic analysis of the mycoplasmas.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 494-498.
8. Johansson, K. E., & Pettersson, B. (2002). **Taxonomy of Mollicutes.** In *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas* (pp. 1-29). Springer US.
9. Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., ... & Van Etten, J. (1989). **A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification.** *Journal of bacteriology*, 171(12), 6455-6467.
10. Hale, H. H., Helmboldt, C. F., Plastring, W. N., & Stula, E. F. (1962). **Bovine mastitis caused by a Mycoplasma species.** *The Cornell veterinarian*, 52, 582-591.
11. FREUNDT, E. (1973). **Type strains of species of the order Mycoplasmatales, including designation of neotypes for Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, Mycoplasma agalactiae subsp. agalactiae, and Mycoplasma arthritidis.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(1), 55-61.
12. ASKAA, G., & ERNØ, H. (1976). **NOTE: Elevation of Mycoplasma agalactiae subsp. bovis to Species Rank: Mycoplasma bovis (Hale et al.) comb. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(3), 323-325.
13. Nicholas, R. A. J. (2011). **Bovine mycoplasmosis: silent and deadly.** *The Veterinary Record*, 168(17), 459-462.
14. Bürki, S., Spärgser, J., Bodmer, M., & Pilo, P. (2016). **A dominant lineage of Mycoplasma bovis is associated with an increased number of severe mastitis cases in cattle.** *Veterinary microbiology*, 196, 63-66.
15. Wise, K. S., Calcutt, M. J., Foecking, M. F., Röske, K., Madupu, R., & Methé, B. A. (2011). **Complete genome sequence of Mycoplasma bovis type strain PG45 (ATCC 25523).** *Infection and immunity*, 79(2), 982-983.
16. Qi, J., Guo, A., Cui, P., Chen, Y., Mustafa, R., Ba, X., ... & Chen, H. (2012). **Comparative genoplasticity analysis of Mycoplasma bovis HB0801 (Chinese isolate).** *PLoS One*, 7(5), e38239.
17. Li, Y., Zheng, H., Liu, Y., Jiang, Y., Xin, J., Chen, W., & Song, Z. (2011). **The complete genome sequence of Mycoplasma bovis strain Hubei-1.** *PLoS one*, 6(6), e20999.
18. National Center for Biotechnology Information. (2017). **Genome Assembly and Annotation report.** Consultado em junho de 2017 em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1150>>
19. Lysnyansky, I., & Ayling, R. D. (2016). **Mycoplasma bovis: mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility.** *Frontiers in microbiology*, 7.

20. Taylor, J. D., Fulton, R. W., Lehenbauer, T. W., Step, D. L., & Confer, A. W. (2010). **The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors.** *Can Vet J*, 51(10), 1095-102.
21. Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J., & Janzen, E. D. (2011). **Mycoplasma bovis infections in cattle.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 772-783.
22. Pfützner, H., & Sachse, K. (1996). **Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle.** *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), 1477-1494.
23. Subramaniam, S., Bergonier, D., Poumarat, F., Capaul, S., Schlatter, Y., Nicolet, J., & Frey, J. (1998). **Species identification of Mycoplasma bovis and Mycoplasma agalactiae based on the uvrC genes by PCR.** *Molecular and cellular probes*, 12(3), 161-169.
24. Dyer, N., Hansen-Lardy, L., Krogh, D., Schaan, L., & Schamber, E. (2008). **An outbreak of chronic pneumonia and polyarthritis syndrome caused by Mycoplasma bovis in feedlot bison (Bison bison).** *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 20(3), 369-371.
25. Horwood, P. F., Schibrowski, M. L., Fowler, E. V., Gibson, J. S., Barnes, T. S., & Mahony, T. J. (2014). **Is Mycoplasma bovis a missing component of the bovine respiratory disease complex in Australia?.** *Australian veterinary journal*, 92(6), 185-191.
26. Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2003). **Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control.** *Research in veterinary science*, 74(2), 105-112.
27. Caswell, J. L., & Archambault, M. (2007). **Mycoplasma bovis pneumonia in cattle.** *Animal Health Research Reviews*, 8(02), 161-186.
28. Jasper, D. E. (1987). **Bovine mastitis due to mycoplasma.** *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)*.
29. Caswell, J. L., Bateman, K. G., Cai, H. Y., & Castillo-Alcala, F. (2010). **Mycoplasma bovis in respiratory disease of feedlot cattle.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 365-379.
30. Edwards, T. A. (2010). **Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 273-284.
31. Lung Protection Therapy – LPT. (2017). **The Need for Lung Protection Therapy in BRD.** Consultado em junho de 2017 em: <http://www.lungprotectiontherapy.com/veterinarians/techinfo_02.asp>
32. König, H. E., Liebich, H. G., & Overall, K. L. (2014). **Veterinary anatomy of domestic animals.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(6), 651-660.
33. Gonçalves, R., Regalla, J., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. J. (2008). **Impact of Mycoplasma bovis infection on serosurveillance for contagious bovine pleuropneumonia.** *Veterinary Record*, 163(21), 632-633.
34. Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., & McVey, D. S. (2010). **Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 381-394.
35. Doyle, D., Credille, B., Lehenbauer, T. W., Berghaus, R., Aly, S. S., Champagne, J., ... & Woolums, A. (2017). **Agreement Among 4 Sampling Methods to Identify Respiratory Pathogens in Dairy Calves with Acute Bovine Respiratory Disease.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
36. Sachse, K., Pfützner, H., Hotzel, H., Demuth, B., Heller, M., & Berthold, E. (1993). **Comparison of various diagnostic methods for the detection of Mycoplasma bovis.** *REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE-OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES*, 12, 571-571.
37. Nicholas, R. A., Fox, L. K., & Lysnyansky, I. (2016). **Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull.** *The Veterinary Journal*, 216, 142-147.
38. Freundt, E. A. (1983). **Culture media for classic mycoplasmas.** *Methods in mycoplasmaology*, 1, 127-135.
39. Tully, J. G. (1983). **Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement.** *Methods Mycoplasmaol*, 1, 355-362.

40. Thurmond, M. C., Holmberg, C. A., & Luiz, D. M. (1989). **Evaluation of a digitonin disk assay to discriminate between achleplasma and mycoplasma isolates from bovine milk.** *The Cornell veterinarian*, 79(1), 71-81.
41. Freundt, E. A. (1983). **Film and Spot Production.** Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J.
42. González, Y. R. C., Bascuñana, C. R., Bölske, G., Mattsson, J. G., Molina, C. F., & Johansson, K. E. (1995). **In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR.** *Veterinary microbiology*, 47(1-2), 183-190.
43. Bashiruddin, J. B., Frey, J., Königsson, M. H., Johansson, K. E., Hotzel, H., Diller, R., ... & Thiaucourt, F. (2005). **Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial.** *The Veterinary Journal*, 169(2), 268-275.
44. Hoorfar, J., Wolffs, P., & Rådström, P. (2004). **Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin.** *Apmis*, 112(11-12), 808-814.
45. Slattery, M. (2002). **The science and art of molecular epidemiology.** *Journal of Epidemiology and Community Health*, 56(10), 728.
46. Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., ... & Brisse, S. (2007). **Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology.** *Clinical Microbiology and Infection*, 13(s3), 1-46.
47. Sachse, K., & Moebius, P. (2015). **Molecular Typing Tools: From Pattern Recognition to Genome-Based Algorithms.** *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*, 287-310.
48. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., & Goering, R. V. (1997). **How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists.** *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18(6), 426-439.
49. Tang, P., Croxen, M. A., Hasan, M. R., Hsiao, W. W., & Hoang, L. M. (2017). **Infection control in the new age of genomic epidemiology.** *American journal of infection control*, 45(2), 170-179.
50. Hyttiä-Trees, E. K., Cooper, K., Ribot, E. M., & Gerner-Smidt, P. (2007). **Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens.** *Future Microbiology*, 2(2), 175.
51. Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). **Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity.** *Journal of clinical microbiology*, 26(11), 2465-2466.
52. Pinho, L., Thompson, G., Rosenbusch, R., & Carvalheira, J. (2012). **Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis.** *Journal of microbiological methods*, 88(3), 377-385.
53. Spargser, J., Macher, K., Kargl, M., Lysnyansky, I., & Rosengarten, R. (2013). **Emergence, re-emergence, spread and host species crossing of *Mycoplasma bovis* in the Austrian Alps caused by a single endemic strain.** *Veterinary microbiology*, 164(3), 299-306.
54. Becker, C. A., Thibault, F. M., Arcangioli, M. A., & Tardy, F. (2015). **Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35years.** *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 118-126.
55. Sulyok, K. M., Kreizinger, Z., Fekete, L., Jánosi, S., Schweitzer, N., Turcsányi, I., ... & Gyuranecz, M. (2014). **Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from Hungary based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis.** *BMC veterinary research*, 10(1), 108.
56. Amram, E., Freed, M., Khateb, N., Mikula, I., Blum, S., Spargser, J., ... & Lysnyansky, I. (2013). **Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle.** *The Veterinary Journal*, 197(2), 286-290.
57. Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2006). **Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis.** In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes* (pp. 83-104). Springer Berlin Heidelberg.

58. Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2009). **Multiple locus variable number of tandem repeats analysis.** *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, 141-15.
59. Nadon, C. A., Trees, E., Ng, L. K., Møller Nielsen, E., Reimer, A., Maxwell, N., ... & Gerner-Smidt, P. (2013). **Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance.** *Euro Surveill*, 18(35), 20565.
60. Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. M. (2002). **Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis.** *Molecular ecology*, 11(9), 1591-1604.
61. Ghaleh Golab Behbahan, N., Asasi, A. R., Afsharif, A. R., & Pourbakhsh, S. A. (2005). **Isolation and detection of *Mycoplasma gallisepticum* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.** *Iranian Journal of Veterinary Research of University Shiraz*, 6(1), 35-41.
62. Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., D'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., & Visca, P. (2011). **Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme.** *Journal of clinical microbiology*, 49(2), 539-548.
63. Chalker, V. J., Pereyre, S., Dumke, R., Winchell, J., Khosla, P., Sun, H., ... & Bébéar, C. (2015). **International *Mycoplasma pneumoniae* typing study: interpretation of *M. pneumoniae* multilocus variable-number tandem-repeat analysis.** *New microbes and new infections*, 7, 37-40.
64. Benson, G. (1999). **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic acids research*, 27(2), 573-580.
65. Pinho, L., Thompson, G., Machado, M., & Carnevali, J. (2013). **Management practices associated with the bulk tank milk prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy herds in Northwestern Portugal.** *Preventive veterinary medicine*, 108(1), 21-27.
66. Humblet, M. F., Boschirol, M. L., & Saegerman, C. (2009). **Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach.** *Veterinary research*, 40(5), 1-24.
67. McAuliffe, L., Kokotovic, B., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. (2004). **Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters.** *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4556-4565.

Anexos

Anexo A1 – Identificação bioquímica de micoplasmas

Tabela A1 - Características bioquímicas para a identificação de micoplasmas de bovinos e de pequenos ruminantes

<i>Mycoplasma</i>	Estirpe Tipo	Sensibilidade à digitonina	Fermentação da glucose	Hidrólise de arginina	Redução do tetrazólio	Actividade fosfatásica	Produção de "film and spot"
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> (anterior <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC)	PG1	+	+	-	+	W	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (anterior <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC)	PG3	+	+	-	+	-	-
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California kid	+	+	±	+	-	-
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>Capripneumoniae</i> (anterior F38 group)	F38	+	+	-	-	-	-
<i>M. alvi</i>	NCTC 10157	+	+	+	-	-	-
<i>M. bovirhinis</i>	NCTC 10118	+	+	-	±	-	±
<i>M. bovoculi</i>	NCTC 10141	+	+	-	+	-	-
<i>M. dispar</i>	NCTC 10125	+	+	-	+	-	±
<i>M. leachii</i> (anterior <i>Mycoplasma</i> sp. bovine group 7)	PG50	+	+	-	+	+	-
<i>M. alkalescens</i>	NCTC 10135	+	-	+	-	+	-
<i>M. arginini</i>	NCTC 10129	+	-	+	±	-	-
<i>M. canadense</i>	NCTC 10152	+	-	+	-	-	-
<i>M. bovigenitalium</i>	NCTC 10122	+	-	-	±	-	+
<i>M. bovis</i>	PG45	+	-	-	+	+	+
<i>M. verecundum</i>	NCTC 10145	+	-	-	-	-	+
<i>M. conjunctivae</i>	NCTC 10147	+	+	-	+	-	-
<i>M. ovipneumonia</i>	NCTC 10151	+	+	-	+	-	-
<i>M. putrefaciens</i>	NCTC 10155	+	+	+	+	+	+
<i>M. agalactiae</i>	PG2	+	-	-	+	+	+
<i>M. gallinarum</i>	NCTC 10120	+	-	+	+	-	+

Legenda: (+) reacção positiva, (W) reacção positiva, mas fraca, (-) reacção negativa (±) reacção positiva ou negativa (Adaptado de bacterio.net, The Mycoplasmas II e de H. ERNØ, 1987).

Anexo A2 – Sequências dos 12 loci em PG45^T

Mbov TR14 (amplicão 555 pb, número de cópias 2,2, repetição de 84 pb, *sequências flankedoras* 373 pb em PG45^T)
AACATTGTTGACACAATCCCATCTGATAACACTC~~ATAGTGCTAACAATAGCAGTAGTGAAAGTGACAAGAGTAAAAATG~~
CAGACAACCTCAAATTCAAATAGTAATTCAAACGTAAACA~~ATAGTGCTAACAATAGCAGTAGTGAAAGTGACAAGAGTAA~~
AAATGCAGACAACCTCAAATTCAAATAGTAATTCAAACGTAAACA~~ATAGTGCTAACAATAGCAGTAGTGAAAGTGACAAGAGTAA~~
ACAGAAAATACTGAAAGATCTTCAAGCGATAATAAAAAATAATGCAAAATACATAAAATATGGCTAAAAAATTATCAATGA
AAAGGTAGAAGACAGTGTCAAATTAACACAATTGACAGTGAACCTAAAGACTTTATTCTTAAGGTTTTTGAGTTTTATA
ATGAGTTGACTCCGCTAGTGATTAACTAAATCTAAGGATATTGACACTAAGAGAAAACATAATGATATTTTCAAGTTT
TGAAAAGAAATTTGGGAAAATAATAGATTCCAAGTCATTACTAAATGAAATTTTTAAAAA~~GGAGGACGAAAAAGCAGCG~~

Mbov TR29 (amplicão 860 pb, número de cópias 4,8 repetição de 116 pb, *sequências flankedoras* 306 pb em PG45^T)
ATCTAATCAGTTATTGCATGCTTAC~~TCAAATAATAAATATGAACAAGCCATGATAAGTTAACATTTTTAACTACTTAATTA~~
GTTTTTGACTGTTGATTAACAAACATAAAGCTAATATTTAATTATTAATTGCTATTTCAAATGCTTTT
TTATTTTCAATCATATTGATAT~~AGCCACTAGAAATTTACTTTGACTACTACCTATTATTGTATAAAATTTGTAACTTAATTT~~
AGATACTGTTTACTTGATATTTCTTAGCAAACCTATAGCCTTATATAGCCTTGTAAGCCACTAGAACTTACTTTGACTA
CTACCTATTATTTGTATAAAATTTGTAACTTGACTAGCTACTGTTTACTTGATATTTCTTAGCAAACCTATAGCCTTATA
TAGCCTTGTAAAGCCACTAGAACTTACTTTGACTACTACCTATTATTGTATAAAATTTGTAACTTGACTAGCTACTGT
TTACTTGATATTTCTTAGCAAACCTATAGCCTTATATAGCCTTGTAAGCCACTAGAACTTACTTTGACTACTACCTATT
ATTTGTATAAAATTTGTAACTTGACTAGCTACTGTTTACTTGATATTTCTTAGCAAACCTATAGCCTTATAGCCTTATA
AAAGCCACTAGAACTTACTTTGACTACTACCTATTATTGTATAAAATTTGTAACTTGACTAGCTACTGTTTACTTGATA
TCTTTTAGCAA~~CATTAGCAACATTTAGCAATTGGATTGGATTGGATTTTTAACTCCTCTTTTTTAATAAAACCAGAT~~
AATATCCTACTGTTTACTGTTTTTTTGA~~CTGTTCTGTTGCTACTTATTACGA~~

Mbov TR30 (amplicão 217 pb número de cópias 2,3 repetição de 51 pb, *sequências flankedoras* 102 pb em PG45^T)*
TGTTTCAGCAGGTATAGAGTCAG~~CCTTGTTTTCTTATCAATTTTATTGTTTTAGTAGTTTCTAATTTTGTTTG~~~~TCAG~~
CTACTTTTTAGAAATTTCTTTTTCAACTGGATCTTTAATTTCTTTT~~TT/AGTTGCTTTTTAGAACTCTCTTTTTTA~~~~ACTGG~~
TTCTTTGTTTCTTTT~~TCAGCTACTTT~~GTGTTG~~CCATCACATGAAGCAGCTATC~~

* o padrão consenso é de 52 pb

Mbov TR31 (amplicão 987 pb número de cópias 5,8 repetição de 102 pb, *sequências flankedoras* 399 pb em PG45^T)
**
ACTTAAATGTGAGTAATAGTTCCACTC~~ATGATTTGAACGATGAGACTCAATATTTCCAAATCAATAATTTAAATCATCA~~
AAGTATTTTGAAGCTTTTATTAAGGCTTCATTTTCTCTTTTGTGTTTTTCAATCTTTTGAAGTTCTTCAAGTTGTTTTA
ATAAGTTTT~~AGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTGATCGTTTTGATTACCTTGAGTTTGTGGGG~~
AAGTATTTGAAGAAGAAGTATCAGAACCAC~~TAGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTGATCGTTTT~~
GATTACCTTGAGTTTGTGGGGAAGTATTTGAAGAAGAAGTATCAGAACCAC~~TAGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTT~~
ACTCTTATCTTCTTGATCGTTTTGATTACCTTGAGTTTGTGGGGAAGTATTTGAAGAAGAAGTATCAGAACCAC~~TAGGG~~
TCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTGATCGTTTTGATTACCTTGAGTTTGTGGGGAAGTATTTGAAGAA
GAAGTATCAGAACCAC~~TAGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTGATCGTTTTGATTACCTTGAGTT~~
TGTGGGGAAGTATTTGAAGAAGAAGTATCAGAACCAC~~TAGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTG~~
ATCGTTTTGATTACCTTGAGTTTGTGGGGTAGTAT~~ATTAATTAATGCTTTTCTGTTGATTCTGTTTTCATATGATG~~
CAGCTATCATTTGGGGAAGAAGTATCAGAACCAC~~TAGGGTCATCTTTTTGTCTTTTCTTTACTCTTATCTTCTTG~~
TTTATAATTTGAACATAAAACCTTAAACAATTTTAGTTGTTTAAATTTACAACATAATTATATAAACAATCTT~~GATGCGA~~
GATATGATCAAAAAAATATTGC

** sublinhada e em itálico a sequência do primer reverse do artigo Becker et al., 2015.

Mbov TR35 (amplicão 242 pb número de cópias 4,0 repetição de 45 pb, *sequências flankedoras* 64 pb em PG45^T)
GTTGTATCATTTTGAATGGGGTCTATC~~TCTGATGGTTTAGATCTTGAACCTTGTCTGATGGTTGGTTGTCTGATG~~
GTTTAGATCCTGAACCTTGTCTGATGGTTTGTCTGTG~~TCTGATGGTTTAGATCTTGAACCTTGTCTGATGGTTGGTT~~
TGTGTCTGACGGTTTAGATTTCTGAACCTTGTCTGATG~~ATTGGTTGCGCCACATGAAGCAGCTACTAGTGGCATAG~~
CTAGCGA

Mbov TR40-41 (amplicão 661 pb número de cópias 4,0 repetição de 39 pb, *sequências flankedoras* em 506 pb PG45^T)
TCCAAGAATTTATAAAGGAGTACTTGG~~CTTTAAATGCGCCAAGCAATGCAATAAAAAATTAACATCAACAGAAAATTTT~~
GCACCTTTGAGTACTCAAAAGTATCTTTTCTTATTCTTTTTTATTCTTTTAGCCATTCTCTTGTCAGAACACCACAAAAAT
TGGTATTATTTTCCAATACTCAAAATAGGTGCTTTTGTCTTGATAATTTATAATTTAATTTAATTTGTAAGAA
CTAACATATGAAAAGAAAATTAATGTTAATAGGGGGGGGGGCTTAGTTTTGCTAGTTCTTTCCCAATGACAGCTGC
TTCATGTGATGTAAAGAAAAAGGATGTTGAACATCTAGCTCAAAAAACAAGGTTCAAAACCC~~AACTCAGAAATCTAAA~~
TCAGAAAAATCAAGATTCAGAAACA~~AACTCACAATCTAAATCAGGAAAAAGAAGATTCA/AAACCCAACTCAGAAATCTAAAT~~
CAGAAAAATCAAGATTCAGAAACA~~AACTCACAATCTAAATCAGGAAAAAGAAGATTCA/AAACCCAACTCAGAAATCTAAAT~~
AATTAACAAAACCTAGTGAAAAGACAAAAATGATATGCCAACAGAAAATTCTGGAATAAACGACTATTTAGATAAAGT
TAT~~GGAATACGGAAGAAGAAGCATCAG~~

Mbov TR49-51 (amplicão 209 pb número de cópias 2,2 repetição de 45 pb, *sequências flankedoras* 113 pb em PG45^T)
GAAAGCATCCTTTTGTCTCTCTATGAT~~TTTTTTAACTTTCTCAATATTATTTTATCTTCTGCTCTGTTTCTCTTTTAA~~
TTCTTTCTCTCTCT/ATTTTCTT/CTTTCTATCTCTATTT~~TTCTTTTCTCTCTCTAATTTCTTTGCTTTTCTCTTTCTA~~
TTTTCTCTTTTCTTTT~~CATCATCTGTTTCTGTTGGATTACTA~~

Mbov TR52 (amplicão 666 pb número de cópias 4,0 repetição de 102 pb, *sequências flanqueadoras* 258 pb em PG45⁷)
CATCATGTCAAAACAAGAAATCGAACAGATGAAAGCATAATTAATAATATTACCCCCCAAACCTATAGATAATCAAAAGC
AACAAAGAAGATAAGAGTAAAGAAGAAAAA**CCTAATGGTTCTGGTAATTCTTCTCCAAATACTACCCACAAACTCAAGA**
TAATCAAAACCACCAAGAAGATAATATTAAAGAAAAAGAACAAAGTGATGACCCTAGTGGTTCTGGTAATTCTTCTCCA
AATACTACCCACAAAT**TTCAAGATAATCAAAACCACCAAGAAGATAATATTAAAGAAAAAGAGCAAAGTGATGAC**CCTA
GTGGTTCTGGTAATTCTTCTCCAAATACTACCCACAAACTCAAGATAATCAAAACCACCAAGAAGATAATATTAAAGA
AAAAGAACAAAGTGATGAC**CCTAGTGGTTCTGGTAATTCTTCTTCAAAATACTAACCCACAAATTTCAAGATAATCAAAAC**
CACCAAGAAGATAATATTAAAGAAAAAGAACAAAGTGATGACCCTAGAGACTTATTAGAACAACCTTGAAAAAATTCGAA
AAGATTATGAAAAACAGAAAAAGAAAATGAAAACCTTAATAAAAAACTCAAATTACTCTGATGTTTTAAATAATTGATTT
GGAGATATTTA**TCGTGGTTCGCCTTGGTCATAAG**

Mbov TR59 (amplicão 428 pb número de cópias 2,4 repetição de 138 pb, *sequências flanqueadoras* 91 pb em PG45⁷)
TGAATCTTGATCTTTTTGGTCTGAGTTAGTTCTCTGA**ATCTTGTTTTTGTTATCGTTCATTGTTTCAGAAGAATTTTTTC**
ATCTGTATGTTCATTTTCACTACTCTTGCCTTCTTCAGATTTGAAGAGTCTTATCTGTTTTCTTCCATCTTTGAATC
TATACCTGCTTTTATCTTGTTTTTGTTATCGTTCATTGTTTCAGAAGAATTTTTTCATCTGTATGTTCATTTTTCATAC**TC**
TTGCCTTCTTCAGATTTGAAGAGTCTTATCTGTTTTCTTCCATCTTTGAATCTATACTGCTTTTATCTTGTTTTTGTT
TATCGTTCATTGTTTCAGAAGAATTTTTTCATCTTTATTTTCATTATCTTAATATCTTTTTCCATTTGTTATCTGCTTTT
GCTTCGGCGATGCAACTAG

Mbov TR147 (amplicão 500 pb número de cópias 2,0 repetição de 75 pb, *sequências flanqueadoras* 350 pb em PG45⁷)
AGGCTCTGTCTTACCTGGATTATCTTTTT**CAGGATCGGTAGGTGGAGCGATTGGAGCATCCATTTCAAGTTCTTTTTT**
AGGCTCCTTAGTTTCATTATTTTTACCAGGATCAGTAGGCGGAGCGATTGGG**GCATCAATTCAGGTTCTTTTTAGG**
CTCCTTAGTTTCATTATTTTTACATGAAGCAGCAATTAAAGGAAGTGAACCTAGCAAAAAGCAACCCCCCCCCCTAATTA
ATATTAGTTTTTTCTTATTCATATTTTGTTGTTCCTTTATTTGATTTATATGCATAAAAAATTTTAATTAGTATATCAAAAAA
GATTGTTTGAATATGAATGAAAATAGCTTAAATAAGAAATTTAAGTTAACAGAAAATGCAATAAAAAAAGTACTACAGAA
AATCTGTAGAACATTTATAAAAAATCTCACTCCTTATTTATTGCAGTTCTATTATTTAGATACTTGCCATAAAATTAGGTA**GT**
TTGAAATAGGAGCACCATT

Mbov TR148 (amplicão 474 pb número de cópias 2,0 repetição de 75 pb, *sequências flanqueadoras* 324 pb em PG45⁷)
TCACTGTGCATAGGCTCTGTCTTACCTGGATTATCTTTTT**CAGGATCGGTAGGTGGAGCGATTGGAGCATCCATTTCA**
GGTTCCTTTTTAGGCTCCTTAGTTTCATTATTTTTACCAGGATCAGTAGGCGGAGCGATTGGG**GCATCAATTCAGGTT**
CCTTTTTAGGCTCCTTAGTTTCATTATTTTTACATGAAGCAGCAATTAAAGGAAGTGAACCTAGCAAAAAGCAACCCCCC
CCCCCTAATTAATATTAGTTTTTTCTTATTCATATTTTGTTGTTCCTTAATTAGTAATTAAGATGTAAAAAATTTTTTAC
AAATTATATCAAAACAAAGACTCTTGCTAATAATGAATTTTTTCAAAAAACGGTAAAGAATATGAAAAACAGCAAAAA
ATGCTGTTTTTGGCGCATAAATTAATGCAAAATGGTGGAGATGTCGGGAGTTGAACC**CGAGTCCACACACCAAGCT**

Mbov TR427 (amplicão 599 pb número de cópias 3,5 repetição de 108pb, *sequências flanqueadoras* 227 pb em PG45⁷)
TCTATGGTGTGAATCCTACCATTAGATATTCTTAGAGCACCTTCACTTACTAAGACATCTAGCTCTTTTTTGCCTCAT
CTTTTTTTTCATCAATTTCAAAAAGTTTCATTGTTATTTTTGTCTAAAAAATCCTTAGTTCAGGTAATCTATATTTTTTGT
AC**TTTGTTCTTTTTGGTTTTTGGAGGAGTTTGTCTTCTGGTTCCTTTGAGGGGTTTGATCCTTTTGGTTTTTGG**
GGAGTTTGTCTTCGTGGTCTTTTGGAGGGTTTGATCCTTTTGGTTTTTGGAGGAGTTTGGTCTTTTGGTCTTTT
GAGGGGTTTGATCCTTTTGGTTTTTGGAGGAGTTTGTCTTCGTGGTCTTTTGGAGGTTTGGTCTTTTGGTCTTT
TGGAGAAGTTTGGTCTTTTGGTCTTTTGGAGGGTTTGATCCTTTTGGTTTTTGGAGGAGTTTGTCTTCGTGGTCC
TTTTGAGGAGTTTGGTCTTTTGGTCTTTTGGAGAAGTTTGGTCTCTTGGTCTTTTGGTGCCTGAGTTTCTCCCATC
CTTCTCTGTTTTCTCTACATC**ACATGCAGCAGCGACTATTG**

Legenda: Letra em negrito e sublinhada representa um *missmatch* p. ex. **A**, letra rasurada (p. ex. **C**) ou **!** representa inserção/deleção (indel), as unidades de repetição encontram-se coloridas. A verde estão as zonas de hibridação dos primers.