

27

Elucidação da epidemiologia da tuberculose bovina pela análise do número variável de repetições nucleotídicas em *tandem* em múltiplos *loci* do genoma de micobactérias patogénicas

Mónica V. Cunha, Ana Canto, Ana Botelho

SUMÁRIO

A técnica de análise do número variável de repetições nucleotídicas em *tandem* em múltiplos *loci* (MLVA-VNTR) tem sido utilizada para caracterizar geneticamente microrganismos, nomeadamente bactérias patogénicas, como é o caso de *Mycobacterium bovis*, o principal agente etiológico da tuberculose bovina. Neste capítulo, descreve-se um protocolo de MLVA-VNTR aplicado à genotipagem de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e, por isso, designado MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units-VNTR*), usando como modelo a espécie *M. bovis*. A metodologia subjacente, baseada na análise de um painel de oito *loci*, consiste em determinar, por eletroforese em gel horizontal de agarose, o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados por reação de polimerase em cadeia (PCR) que contêm as regiões VNTR de interesse, possibilitando a estimativa do número de cópias das repetições presentes e que correspondem a variantes alélicas nesses *loci*.

INTRODUÇÃO

Nos organismos eucariotas e procariotas existem regiões genómicas com sequências repetidas de nucleótidos de tamanho variável, que são denominadas minissatélites, quando o tamanho da sequência que se repete varia entre 10–100 pares de bases, e microssatélites, quando o tamanho varia entre 1–13 pares de base¹. Estes *loci* podem ser de vários tipos, entre os quais MPTR (*major polymorphic tandem repeat*), quando a sequência repetida apresenta variabilidade nucleotídica, ou ETR (*exact tandem repeat*), quando a sequência repetida é totalmente idêntica. Pode ainda verificar-se hipervariabilidade em alguns *loci*, que apresentam um número variável de repetições em *tandem*, VNTR, resultante da inserção ou eliminação de uma ou mais cópias da sequência que se repete. Esta variação, cuja origem se

desconhece mas que se pode dever a erros na replicação do DNA, resulta no alongamento ou encurtamento da região. A existência destes *loci* polimórficos em bactérias patogénicas de animais e/ou zoonóticas tem sido explorada no desenvolvimento de métodos de tipificação moleculares, sendo ferramentas importantes em estudos epidemiológicos. A MLVA é o método de genotipagem mais amplamente usado em microrganismos patogénicos e zoonóticos como é o caso dos agentes da febre Q (*Coxiella burnetii*), brucelose (*Brucella* spp.) e da tuberculose (TB) humana e animal, causada pelos membros do MTBC. Este complexo inclui sete espécies/ecótipos patogénicos, intimamente relacionados a nível do seu genoma, que causam doenças semelhantes em diferentes hospedeiros, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da TB humana, e *M. bovis*, associado à TB bovina, zoonose

endêmica em alguns países e com considerável impacto a nível mundial. À luz do atual conhecimento, postula-se que as populações contemporâneas dos ecótipos do MTBC são essencialmente clonais, descendendo de um ancestral comum, tendo evoluído a partir de eliminações sucessivas de regiões do genoma, o que lhes terá conferido tropismo para diferentes espécies hospedeiras².

Os *loci* MLVA de micobactérias patogênicas foram identificados por Supply e colaboradores¹ em regiões intergênicas dispersas pelo genoma das diferentes espécies do MTBC, sendo denominados MIRU-VNTR. Foram mapeados 41 *loci* MIRU no cromossoma da estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv, com unidades de repetição que variam entre 40 a 100 pares de base. A amplificação e avaliação do tamanho destes *loci* permitem a determinação do número de repetições existentes em cada *locus* para cada estirpe, correspondendo a um perfil alélico numérico¹. No caso de *M. tuberculosis*, o método MIRU-VNTR começou por incluir um painel de 12 *loci*, que foi depois alargado para 24^{3,4}, de modo a aumentar a capacidade discriminatória.

Micobactérias dos complexos MTBC⁵ com origem em Portugal têm sido genotipadas por avaliação do número de unidades que se repetem em *tandem* nessas regiões.

Para a genotipagem de *M. bovis*, foi selecionado um painel de nove *loci*, designados por VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, MIRU-26, QUB11b, QUB11a, ETR-C, MIRU-4 e VNTR4156, considerado o mais discriminatório para estudos epidemiológicos⁶. Estudos posteriores avaliaram estes *loci* para distintas populações geográficas de *M. bovis* e diferentes cenários epidemiológicos, tendo sido estabelecido um painel de oito *loci* (Tabela 27.1) mais discriminatório para a população de isolados de *M. bovis* obtidos em Portugal a partir de espécies pecuárias e espécies selvagens^{5,7}.

A genotipagem por MIRU-VNTR consiste na amplificação destes *loci* pela PCR através do uso de sequências oligonucleotídicas

iniciadoras (*primers*) para as regiões que os flanqueiam. O tamanho dos produtos de PCR está relacionado com o número de repetições presentes em cada *locus*, ao qual vai corresponder um determinado alelo. A determinação do tamanho dos produtos de PCR para cada *locus* pode ser efetuada por eletroforese horizontal em gel de agarose, visto que as diferenças no tamanho do número de cópias variam, no mínimo, 40 pares de base; por eletroforese capilar em sistemas automatizados, usando *multiplex* PCR e *primers* marcados com fluoróforos^{3,8}; ou, ainda, por HPLC (*high pressure liquid chromatography*)⁹. As variações do número de repetições identificadas em cada *locus* correspondem a variantes alélicas, sendo que o perfil numérico resulta da associação dos alelos presentes em todos os *loci* analisados.

1. MATERIAL

- Estirpe de referência a usar como controlo positivo nas reações de PCR e na estimativa do tamanho dos produtos de amplificação: *M. tuberculosis* H37Rv (VV-E-481) (coleção do Laboratório de Referência Europeu para a Tuberculose Bovina – VISAVET, UCM, Madrid).
- Estirpes de *M. bovis* isoladas de amostras clínicas de bovinos diagnosticados com tuberculose bovina.
- Tampão TE (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA. Esterilizar em autoclave (15 minutos, 121 °C) e armazenar à temperatura ambiente.
- *Primers* específicos para amplificação dos oito *loci* selecionados (ver Tabela 27.1).
- Solução de trabalho dos *primers*: dissolver os *primers* liofilizados em TE ou em água livre de nucleases, de acordo com as instruções do fabricante. As soluções *stock* são preparadas de forma a obter uma concentração de 100 µM. Fazer alíquotas das soluções *stock* e armazenar a -20 °C. Diluir uma alíquota da solução

TABELA 27.1 Sequência dos iniciadores para cada um dos oito loci MIRU-VNTR.

Locus	Alias	Iniciadores (sequência 5' / 3')
VNTR3232	QUB3232short	3232F- CGGCGATGGTGCCGCCATG 3232R- CTTGGTGAAGGCCCGCATG
ETR-A	VNTR2165	ETRaF- AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT ETRaR- CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
ETR-B	VNTR2461	ETRbF- GCGAACACCAGGACAGCATCATG ETRbR- GGCATGCCGGTGATCGAGTGG
ETR-C	VNTR0577	ETRcF- CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT ETRcR- AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
QUB11b	VNTR2163b	11bF- CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG 11bR- CGAAGTGAATGGTGGCAT
QUB11a	VNTR2163a	11aF- CCCATCCCGCTTAGCACATTTCGTA 11aR- TTCAGGGGGGATCCGGGA
MIRU-4	VNTR0580; ETR-D	4F- GCGCGAGAGCCCGAACTGC 4R- GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU-26	VNTR2996	26F- TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC 26R- CATAGGCGACCAGGCCGAATAG

Aliases: ?
OK?
Aliases?

stock de primers em água livre de nucleases, de forma a obter-se uma concentração de trabalho de 10 μ M.

- Mistura de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP) (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), na concentração de 10 mM (armazenados a -20 °C).
- Polimerase termoestável para PCR (Taq DNA polimerase), tampão da enzima (o tampão poderá ter ou não incorporado os constituintes do tampão de deposição), e solução de MgCl₂ na concentração de 25 mM. Estes produtos são armazenados a -20 °C.
- Tampão TBE 1× (0,089 M ácido bórico; 0,089 M Tris; 0,02 M EDTA; pH 8,0); esterilizar em autoclave (15 minutos, 121 °C) e armazenar à temperatura ambiente.
- Brometo de etídio 1% (m/v) ou outro agente intercalável de DNA com menor toxicidade.
- Gel de agarose a 1,5% (m/v) em tampão TBE 1×: pesar a agarose, dissolver em TBE 1× por aquecimento em micro-ondas. Arrefecer, sem deixar solidificar,

e adicionar brometo de etídio (5 μ L da solução a 1% por cada 100 ml de solução de agarose). Homogeneizar bem, verter no suporte de eletroforese, deixar solidificar, colocar na tina de eletroforese, e cobrir a superfície do gel com tampão TBE 1×.

- Tampão de deposição da amostra, diluído de 1:5 (por exemplo, azul de bromofenol).
- Marcador de massas moleculares contendo fragmentos adequados aos tamanhos dos fragmentos esperados (Tabela 27.1).
- Agarose.
- Tina horizontal de eletroforese, suporte de géis de agarose e pente com número de poços adequado.
- Fonte de alimentação.
- Centrifuga de bancada.
- Termociclador.
- Vortex. Agitadora tipo vortex
- Banho seco.
- Transiluminador de luz ultravioleta (UV) e sistema de aquisição de imagem.

2. PROCEDIMENTO OPERACIONAL

2.1. Extração de DNA genómico a partir de culturas puras de *M. bovis*

A extração do DNA genómico tem de ser realizada em laboratório de segurança biológica de nível 3, pelo elevado risco de contaminação do operador e do meio ambiente circundante. O operador pode ser infetado pela inalação de aerossóis, contactos com as vias respiratórias e/ou com as mucosas conjuntival e oral. Assim, durante o procedimento, têm de ser cumpridas escrupulosamente todas as regras de biossegurança, utilizando equipamento de proteção individual descartável (luvas, máscaras, batas, toucas e protetores de sapatos), material de laboratório descartável com segurança biológica (por exemplo, pontas de micropipetas com filtro), e evitando-se a formação de aerossóis na preparação das suspensões de DNA. O DNA genómico de cada isolado de *M. bovis* a usar na PCR é extraído por ebulição pela simplicidade subjacente e para minimização de exposição do operador às células vivas do microrganismo.

1. Retirar uma ou mais colónias do isolado a partir do meio de cultura sólido, sem retirar agar, e ressuspender em 300 µL de TE num tubo de rosca, agitando.
2. Centrifugar a 15 000×g à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e descartar o sobrenadante.
3. Ressuspender o sedimento em 50–100 µL de TE, consoante o seu tamanho, e agitar.
4. Incubar a 95 °C, durante 45 minutos, usando banho seco.
5. Centrifugar a suspensão a 15 000×g, durante 1 minuto.
6. Transferir o sobrenadante (que contém o DNA) para um novo tubo.
7. Após os passos de inativação térmica e extração, o DNA pode ser guardado a -20 °C fora do laboratório de segurança

biológica de nível 3. As operações subsequentes podem ser realizadas em câmara de segurança biológica classe I.

2.2. Amplificação das regiões VNTR por PCR

1. Diluir o DNA de 1:10 em tampão TE.
2. O ensaio de MIRU-VNTR consiste na amplificação em separado de oito *loci* por PCR simples. Incluir em cada ensaio o DNA das estirpes de referência como controlos positivos. As PCR são preparadas em câmara de fluxo laminar horizontal, previamente esterilizada com iluminação UV, ou em zona branca estéril (ausência de moléculas de DNA).
3. As reações de amplificação para cada *locus* são feitas num volume final de 25 µL. Preparar num microtubo uma mistura de reação (*master-mix*), tendo em consideração o número total de amostras a analisar, incluindo um controlo positivo (*M. tuberculosis* H37Rv) e um controlo negativo (água estéril, livre de nucleases). Para cada *locus*, cada reação individual deverá conter: tampão de reação da polimerase 1×, 200 µM de cada dNTP, 0,4 mM de cada par de *primers* (*forward* e *reverse*) (ver Tabela 27.1), 3 µM de MgCl₂ para os *loci* MIRU/4 e MIRU/26, ou 1,5 µM de MgCl₂ para os restantes *loci*, e 0,02 unidades de *Taq* DNA polimerase; fazer o volume a 22,5 µL com água estéril, livre de nucleases.
4. Distribuir 22,5 µL da mistura reacional em microtubos de 200 µL. Numa outra sala (zona verde), adicionar a cada microtubo 2,5 µL de amostra de DNA diluído de 1/10 (ver ponto 1). São incluídos em cada série de ensaios um controlo positivo [2,5 µL de DNA da estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv (VV-E-481)], e um controlo negativo (2,5 µL de água estéril livre de nucleases, que é adicionada por último).

5. Colocar os microtubos no termociclador e aplicar o seguinte programa: passo inicial de 95 °C durante 5 minutos, para a desnaturação das cadeias de DNA, seguido de 40 ciclos constituídos por: desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, hibridação a 59 °C durante 1 minuto, alongação a 72 °C durante 1,5 minuto; segue-se um passo final de alongação a 72 °C durante 10 minutos. Conservar a 4 °C ou a -20 °C até posterior utilização.

2.3. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR

1. A massa molecular dos fragmentos amplificados é estimada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v).
2. A cada produto de amplificação, adicionar 5 µL de tampão de deposição da amostra, misturar e descarregar 5 µL no gel, colocando, lado a lado, os produtos correspondentes ao mesmo *locus* amplificado, incluindo o produto de PCR correspondente da estirpe de referência. Colocar, no primeiro e no último poços do gel, e também de 5 em 5 poços, 5 µL de marcador de massas moleculares (com fragmentos espaçados de 100 pares de base).

3. Submeter a eletroforese, durante 5 horas, a uma voltagem constante de 90 V.
4. Após a separação eletroforética, os produtos de PCR são visualizados sob luz UV e a imagem deve ser capturada, preferencialmente, por um sistema fotográfico digital.

2.4. Determinação do número de unidades de repetição em cada *locus*

1. O tamanho de cada amplicão é determinado tendo como referência o controle positivo (estirpe H37Rv) e o marcador de massas moleculares.
2. O número de unidades de repetição em cada *locus* é deduzido com base numa tabela de interpretação (ver Tabela 27.2), que compila a informação presente na base de dados <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/view.php>, e que permite definir, para cada *locus*, a relação entre a massa molecular dos produtos de amplificação obtidos e o número de repetições correspondente.
3. Recorrendo à Tabela 27.2, o tamanho dos amplicões é convertido em número de repetições, sendo o resultado global para os *n loci* analisados dado na forma de um código de *n* algarismos (perfil numérico).

CONCLUSÕES

O tamanho dos produtos de amplificação obtidos para cada *locus* pode ser deduzido utilizando diferentes abordagens metodológicas, no entanto a precisão exigida está relacionada com o tamanho da unidade de repetição dos *loci* avaliados. Nos *loci* aqui descritos, é normalmente utilizada a eletroforese em gel de agarose para estimar o tamanho dos amplicões correspondentes. No entanto, essa avaliação nem sempre é óbvia, visto existirem unidades de repetição parciais. Nestes casos, usa-se a anotação 0', 1', 2', 3', etc. Um exemplo em que esta situação se verifica com alguma frequência é o *locus* MIRU/4 que, nas estirpes *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e H37Ra, e em menos de 1% de estirpes clínicas, apresenta os alelos 0' (122 pares de base), 1' (199 pares de base), 2' (276 pares de base), e 3' (353 pares de base) (ver Tabela 27.2). Foram, entretanto, desenvolvidos processos automatizados baseados em eletroforese capilar e sequenciação que permitem estimar com maior rigor e reprodutibilidade o número de repetições em cada *locus* e que têm particular interesse na avaliação de repetições em *tandem* muito pequenas (regiões microssatélites).

lidel: todos
começa aqui
ou prefere a
começa apenas
dps da Tabela
(crescendo 2pp.)
?

1-
Autores:
confiável

TABELA 27.2 Correspondência entre o tamanho (pares de base) do produto de amplificação (amplificação) de um locus e o número de repetições em tandem (alelo) desse locus.

Locus	Tamanho da repetição parcial (pares de base)	Região flangeadora* (pares de base)	Número de repetições (alelo)													Controlo positivo M. tuberculosis H37Rv		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Pares de base	Alelo	
			Ampliação* (pares de base)															
VNTR3232	56/48	181	133	181	237	293	349	405	461	517	573	629	685	741	797	853	461	5
ETR-A	75/23	195	172	195	270	345	420	495	570	645	720	795	870	945	1020	1095	420	3
ETR-B	57/6	121	115	121	178	235	292	349	406	463	520	577	634	691	748	805	292	3
ETR-C	58/37	206	169	206	264	322	380	438	496	554	612	670	728	786	844	902	382	3
QUB11a	69/15	167	152	167	236	305	374	443	512	581	650	719	788	857	926	995	305	3
QUB11b	69/9	67	58	67	136	205	274	343	412	481	550	619	688	757	826	895	412	5
MIRU4	77/53	122/175	122	175	252	329	406	483	560	637	714	791	868	945	1022	1099	353	3'
MIRU26	51/8	285	277	285	336	387	438	489	540	591	642	693	744	795	846	897	438	3

*Amplificação usando os iniciadores indicados na Tabela 27.1

Região flangeadora: alinhada 1º e última repetição

A

*1-
Antes:
empalme
fundo + escudo.
OK?*

*Grat:
ocult@vesta
página proprietária/
pt n' heitrekal leiturs.*

Os dados fornecidos por estes métodos são facilmente armazenados e comparados entre laboratórios através de bases de dados internacionais, acessíveis pela Internet. Para possibilitar a comparação de códigos entre diferentes estirpes, a ordem dos *loci* deve ser mantida constante num mesmo estudo epidemiológico. Também na comparação com bases de dados internacionais, como MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>)^{10,11}, deve ter-se em atenção a ordem dos *loci* usada pelos outros autores no perfil numérico. A análise dos oito *loci* MIRU-VNTR, considerados mais polimórficos na população de *M. bovis* isolada em Portugal⁵, permite obter um código (perfil) de oito algarismos. Usando a ordem de *loci* estabelecida (VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU/4 e MIRU/26), o código MIRU-VNTR da estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv (VV-E-481) é: 5 3 3 3 3 5 3' 3 (ver Tabela 27.2).

A capacidade discriminatória da caracterização molecular de estirpes por MIRU-VNTR é calculada globalmente, através do número de perfis alélicos obtidos de isolados de diferentes unidades epidemiológicas, e também individualmente para cada *locus*, usando o índice de Hunter-Gaston (h)^{12,13}. Para este cálculo, podem ser utilizadas ferramentas bioinformáticas disponíveis online ou o programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica).

Como a capacidade discriminatória de cada *locus* varia em diferentes populações de *M. bovis* localizadas em várias regiões do globo, justifica-se a seleção prévia do painel de *loci* mais discriminatório para cada região, caso se queira fazer um estudo epidemiológico a nível regional.

Para a população de *M. bovis* isolada em Portugal, o método de MIRU-VNTR, utilizando o painel de oito *loci* aqui descrito, permite obter um poder discriminatório elevado (h=0,96)^{5,7}, sendo uma boa ferramenta laboratorial numa perspetiva de abordagem hierárquica, complementando o genótipo de estirpes previamente caracterizadas por spoligotipagem, que se baseia na análise de uma região independente do genoma, a região *direct repeat* (DR)¹⁴. Considerando os isolados obtidos em Portugal genotipados até ao presente momento, os *loci* mais discriminatórios são: VNTR3232 (h=0,57), ETR-A (h=0,63), QUB 11b (h=0,58) e MIRU/26 (h=0,58).

A spoligotipagem é um método adequado para avaliar a estrutura da população de *M. bovis* existente numa determinada região ou país, que complementada com o método MIRU-VNTR permite investigar um determinado surto e as fontes e vias de transmissão da TB bovina¹⁴. Recentemente, foram publicados estudos descrevendo a comparação molecular de estirpes do MTBC tendo por base a análise de sequências completas dos seus genomas, obtidos por recurso aos sistemas de sequenciação de última geração (NGS/~~next-generation sequencing~~). A utilização destas metodologias visa uma maior resolução em estudos taxonómicos e filogenéticos. No entanto, numa perspetiva complementar, a spoligotipagem e MIRU-VNTR continuam a ser ferramentas muito úteis no estudo da estrutura genética de uma população a nível local ou global, permitindo responder a questões epidemiológicas complexas.

A análise dos dados relativos à movimentação de bovinos e de inquéritos epidemiológicos, associados aos dados de genotipagem, permite inferir a origem de uma infeção por *M. bovis*. Registam-se casos em que o surto de tuberculose bovina numa dada exploração pode ter sido originado pelo movimento de animais, pela introdução de um animal infetado, ou por reativação^{5,7,14}. A genotipagem de isolados de espécies silvestres e a comparação com os genótipos de isolados de espécies domésticas são essenciais para determinar a ocorrência de transmissão entre espécies, a existência de um ciclo silvestre da doença, e a presença de reservatórios de manutenção que são responsáveis pela transmissão horizontal e vertical num dado ecossistema. Quando dois genótipos baseados nos perfis de spoligotipagem/MIRU-VNTR são idênticos entre, por exemplo, isolados de javalis e bovinos ou entre veados e bovinos, em áreas geográficas adjacentes, suspeita-se que houve transmissão de *M. bovis* entre espécies silvestres e domésticas. Também as

explorações de outras espécies domésticas, não sujeitas a qualquer tipo de controlo, como os caprinos, ovinos ou suínos, podem ser infetadas por este ecótipo, nomeadamente quando o maneuseamento é feito em regime extensivo e/ou em explorações mistas^{5,7,14}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 36:762–771.
- 2 Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Glyn Hewinson R, Smith Maynard J (2006). Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theoret Biol.* 239:220–225.
- 3 Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C (2001). Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol.* 39:3563–3571.
- 4 Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes M, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D (2006). Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 44:4498–4510.
- 5 Duarte E, Domingos M, Amado A, Botelho A (2010). MIRU-VNTR typing adds discriminatory value within *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* spoligotyping defined groups. *Veterinary Microbiology.* 143,299–306.
- 6 Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M (2006). Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 44:1951–1962.
- 7 Cunha MV, Matos F, Canto A, Albuquerque T, Alberto JR, Aranha JM, Vieira-Pinto M, Botelho A (2012). Implications and Challenges of Tuberculosis in Wildlife Ungulates in Portugal: a Molecular Epidemiology Perspective. *Research in Veterinary Science.* 92(2):225–235.
- 8 Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M (2004). Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis.* 39:783–789.
- 9 Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G (2004). Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and non-denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 42:4175–4180.
- 10 Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S (2008). Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 46(8):2692–2699.
- 11 Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D (2010). MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* 38 Suppl:W326–331.
- 12 Hunter PR, Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology.* 26,2465–2466.
- 13 Hunter PR (1990). Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *J Clin Microbiol.* 28,1903–1905.
- 14 Duarte EL, Domingos M, Amado A, Botelho A (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet Microbiol.* 130:415–421.