

Elaine Maria Seles Dorneles

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Brucella abortus EM UM FOCO DE BRUCELOSE**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Coorientadora: Dr^a Giovanna Ivo Andrade

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2011**

D713a Dorneles, Elaine Maria Seles, 1985-
Avaliação da diversidade genética de isolados de *Brucella abortus*
em um foco de brucelose / Elaine Maria Seles Dorneles. – 2011.
42p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage
Co-orientadora: Giovanna Ivo Andrade
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Brucelose em bovino – Teses.
3. *Brucella abortus* – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Andrade,
Giovanna Ivo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 695 7

Dissertação defendida e aprovada em 04 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente



Prof.^a. Karina Leite Miranda



Prof. Marcos Bryan Heinemann

À

Minha amada família, Mamãe, Leandro, Fernanda e Paulo pelo amor e incentivo, dedico esta conquista.

"Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

Antoine de Saint-Exupéry em "O Pequeno Príncipe"

AGRADECIMENTOS

A Deus que tornou tudo possível.

À minha mãe, Adeilde, e aos meus irmãos Leandro e Fernanda pelo amor incondicional, motivação e carinho.

Ao meu noivo, Paulo, pelo amor, companherismo e paciência.

Ao Andrey pela oportunidade, amizade, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Marcos pelo apoio e amizade.

Aos colegas do LBA por todo o carinho e incentivo, em especial, à Jordana, Telma, Ethiene, Rebeca e Juliana pela fundamental contribuição neste trabalho. À Ana Paula, Monalisa, Fábria, Giovanna, Fernanda, Karinão, Clarice, Danilo, Eduardo e Simone pela amizade e carinho. Tenho muita sorte de tê-los conhecido!

À Cíntia pelo carinho e amizade.

Aos amigos do GE, Fabíola, Karine, Jane, Luiz Felipe, Guilherme e Adriana pelos momentos de descontração e pelo carinho. Também amo vocês!

A todos os técnicos e funcionários do DMVP e FEP-MVZ que colaboram de maneira essencial para realização desse trabalho. Especialmente a Grazielle, Graciela, Anita, Eduardo, Mirli e Renata.

Ao CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro ao projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
3. LITERATURA CONSULTADA	11
3.1. Brucelose bovina	11
3.2. Diagnóstico	14
3.3. Epidemiologia molecular e número variável de repetições em Tandem (<i>VNTR</i>)	15
3.4. Análise de múltiplos <i>loci</i> de <i>VNTR</i> (<i>MLVA</i>)	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Local	19
4.2. Coleta das amostras	19
4.3. Isolamento	20
4.4. Biotipificação	20
4.5. Obtenção do DNA genômico	20
4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) gênero-específica	20
4.7. PCR espécie específica	21
4.8. Análise de múltiplos <i>loci</i> de <i>VNTR</i> (<i>MLVA 16</i>)	21
4.9. Análise dos genótipos	22
5. RESULTADOS	24
5.1. Sorologia	24
5.2. Isolamento e Identificação	24
5.3. <i>MLVA 16</i>	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras de referência usadas no estudo como controles nos ensaios de identificação, biotipificação e PCR	22
Tabela 2 – Iniciadores utilizados nos painéis 1, 2A e 2B do <i>MLVA 16</i>	23
Tabela 3 – Resultado da identificação e genotipificação dos isolados de <i>B. abortus</i> em um foco de brucelose	26
Tabela 4 – Número de repetições encontrado em cada <i>locus</i> do <i>MLVA 16</i> para as amostras de <i>B. abortus</i> isoladas do foco de brucelose	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência de animais positivos para brucelose no foco estudado entre maio de 2009 e novembro de 2010.....24

Figura 2 – Gel de agarose a 1% mostrando amplificação pela PCR gênero-específica para *Brucella* spp. corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); canaletas 2, 4, 5, 7, 10 e 11: isolados pertencentes ao gênero *Brucella*; canaletas 3, 6, 8 e 9: isolados com resultado negativo à PCR gênero-específica; canaleta 12: controle negativo; canaleta 13: amostra de referência 544.....25

Figura 3 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação da PCR multiplex AMOS-estendido corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 1 e 14: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); canaleta 2 e 3: isolados de *Brucella* spp. sem identificação de espécie na PCR multiplex AMOS-estendido; canaletas de 4 a 7: isolados identificados como *B. abortus* amostra vacinal RB51; canaleta 8: *B. abortus* 544; canaleta 9: RB51; canaleta 10: *B. suis* 1330; canaleta 11: *B. melitensis* 16M; canaleta 12: B19; canaleta 13: controle negativo...25

Figura 4 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação da PCR multiplex Bruce-ladder corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaletas 1 a 4: isolados identificados como *B. abortus*; canaleta 5: B19; canaleta 6: RB51; canaleta 7: *B. abortus* 544; canaleta 8: controle negativo; canaleta 9: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA)...27

Figura 5 – Gel de agarose a 2% mostrando a amplificação do painel 1 do MLVA 16 (Bruce 06, 08, 11, 12, 42, 43, 45 e 55) de oito isolados de *B. abortus* oriundos de um único foco de brucelose corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaletas 1, 2, 5 e 8: perfil genotípico A; Canaleta 3: perfil genotípico B; Canaletas 4, 6 e 7: perfil genotípico C; M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England, EUA).....28

Figura 6 – Gel de agarose 3% mostrando a amplificação dos painéis 2A (Bruce 18, 19 e 21) e 2B (Bruce 04, 07, 09, 16 e 30) do MLVA 16 de oito isolados de *B. abortus* oriundos de um único foco de brucelose corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 3: perfil genotípico B; Canaletas: 4, 6 e 7: perfil genotípico C; Canaleta 9: perfil genotípico 16M; M: marcador de peso molecular 25bp Step Ladder (Promega, EUA).29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo 139/10 Comitê de Ética em Experimentação Animal.....42

RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a diversidade genotípica de isolados de *B. abortus* oriundos de um foco de brucelose em função do tempo e espécime clínico a partir do qual se obteve o isolado e, dessa forma, investigar a estabilidade dos marcadores utilizados no MLVA 16. Durante 13 meses foram coletadas 261 amostras clínicas de bovinos pertencentes a um foco de brucelose, sendo 161 de suabes vaginais e 100 de leite, as amostras foram submetidas ao isolamento, biotipificação, identificação molecular e genotipificação pelo MLVA 16. Nove isolados obtidos de suabes vaginais foram identificados como RB51. Dezoito isolados, sete de leite e onze de suabes vaginais, foram identificados como *B. abortus* biovariedade 3 selvagem. E, um isolado de suabe vaginal foi identificado como *B. abortus* biovariedade 1 selvagem. Três perfis genotípicos distintos foram obtidos: o genótipo A, foi observado em todos os isolados identificados como amostra selvagem/biovariedade 3; genótipo C, foi encontrado em todos os isolados da amostra vacinal RB51; e o genótipo B, foi observado no isolado de *B. abortus* amostra selvagem/biovariedade 1. A análise dos dados epidemiológicos e moleculares indica que o genótipo B não está relacionado aos demais genótipos encontrados no foco e que se trata da introdução de nova amostra selvagem na unidade produtiva. Assim, é possível concluir que existe uma baixa diversidade genética entre os isolados, mesmo quando avaliados durante um período de 13 meses e a partir de materiais clínicos distintos; e que os marcadores que compõem o MLVA 16 são estáveis quando submetidos à pressão seletiva nas infecções naturais.

Palavras-chave: brucelose bovina, genotipificação, *B. abortus*, MLVA 16.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the genetic diversity of isolates of *B. abortus* from a single outbreak of brucellosis in function of time and clinical specimen from which the isolate was obtained, and thus indirectly investigate the stability of the *MLVA 16* markers. Two hundred and sixty-one clinical samples of cattle belonging to an outbreak of brucellosis were collected during 13 months, 161 samples of vaginal swabs and 100 milk samples, which were submitted to culture, biotyping, molecular identification and genotyping by *MLVA 16*. Nine *B. abortus* strains isolates obtained from vaginal swabs were identified as RB51. Eighteen isolates, seven obtained from milk samples and eleven from vaginal swabs, were identified as *B. abortus* biovar 3 field strain. One isolate obtained from vaginal swab was identified as *B. abortus* biovar 1 field strain. Three distinct genotypic profiles were obtained from the outbreak of brucellosis: the genotype A, was observed in all isolates identified as *B. abortus* biovar 3; the genotype C was found in all isolates of RB51 vaccine strain; and the genotype B was observed in the isolate of *B. abortus* field strain / biovar 1. The analysis of epidemiological and molecular data indicates that genotype B is not related to the other genotypes found in focus, and that it is probably introduction of a new field strain in the herd. Thus, it is possible concluded that there is low genetic diversity among isolates, even when evaluated over a period of 13 months and from different clinical materials, and that the markers that make up the *MLVA 16* are stable when subjected to selective pressure in natural infections.

Keywords: bovine brucellosis, genotyping, *B. abortus*, *MLVA 16*.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque na produção de carnes e leite. É atualmente o líder mundial nas exportações de carne bovina e possui o maior rebanho bovino comercial com cerca de 205 milhões de cabeças (IBGE, 2010). As riquezas geradas pelo agronegócio brasileiro representam cerca de 33% do Produto Interno Bruto (PIB) do país e estima-se que somente a pecuária seja responsável por 11% do PIB (ABIEC, 2010). As maiores exigências dos mercados importadores de carnes é a qualidade sanitária destes produtos e, neste contexto, após a erradicação (área livre com vacinação) da febre aftosa da maior parte do país (OIE, 2008), a brucelose e a tuberculose animal tornam-se os principais alvos de vigilância epidemiológica (Miranda et al., 2008).

A brucelose é uma das principais zoonoses em saúde pública e animal e em significância econômica no mundo. Encontra-se disseminada por vários países e afeta diferentes espécies animais, além do homem (WHO, 1997). Em bovinos, a infecção é predominantemente causada por *Brucella abortus* (Corbel et al., 2006) e os prejuízos econômicos relacionados à doença decorrem do descarte de animais, queda na produção e desvalorização da atividade, com consequente instalação de barreiras sanitárias que impõem severas restrições ao comércio internacional dos animais e de seus produtos (Corbel et al., 2006; OIE, 2008).

No Brasil, a brucelose bovina decorrente da infecção por *Brucella abortus* é a mais prevalente e está presente de modo endêmico por todo o território nacional (Poester et al., 2002). Assim, com o objetivo de ampliar o controle de brucelose e tuberculose no país e de produzir alimentos mais seguros e de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu, em 2001, (Miranda et al., 2008) o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), cujo principal objetivo é reduzir a

prevalência e incidência de brucelose e tuberculose no país.

O êxito dos programas de controle e erradicação da brucelose está associado à importância de não apenas detectar, mas também identificar as espécies, biovars e genótipos de *Brucella* envolvidos nas infecções naturais. A partir das técnicas de tipificação disponíveis é possível identificar fontes comuns de infecção, investigar as relações epidemiológicas espaciais, avaliar a microevolução do agente frente à pressão de seleção estabelecida pelo ambiente e pelo hospedeiro e ainda gerar dados que possam contribuir para a taxonomia do grupo (Vergnaud e Pourcel, 2006; Whatmore et al., 2007; Al Dahouk et al., 2007)

Classicamente, as bactérias do gênero *Brucella* são identificadas com base em suas características fenotípicas, como requerimento de CO₂, produção de H₂S, hidrólise de uréia, inibição do crescimento em corantes (fucsina e tionina), aglutinação em soro monoespecífico e fagotipagem (Alton et al., 1988). No entanto, é importante salientar que os testes bacteriológicos necessitam de laboratórios especializados para serem realizados, possuem características subjetivas que requerem treinamento e experiência, além de oferecerem um potencial risco de infecção para quem os manipula (Bricker, 2002).

As ferramentas para amplificação de ácidos nucléicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm se popularizado nos últimos anos na identificação de *Brucella* spp. e tem sido amplamente utilizadas a partir de materiais de abortos, sangue e sêmen. Além de identificar algumas dessas técnicas permitem também a classificação das espécies de *Brucella* envolvidas nas infecções (Fekete et al., 1992; Romero et al., 1995; Leal-Klevezas et al., 1995; Queipo-Oturno et al., 1997; Richtzenhain et al., 2002; Bricker e Halling, 1995; López-Goni et al., 2008).

Recentemente, uma ferramenta de tipificação molecular com alta capacidade

discriminatória e reprodutibilidade, conhecida como *Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats-VNTR Analysis (MLVA)*, primeiramente descrita por Le Flèche et al. (2006) (*MLVA 15*) e adaptada por Al Dahouk et al. (2007) (*MLVA 16*), foi proposta para análise genética do gênero *Brucella* (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). O *MLVA 16* tem se mostrado uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos da brucelose no mundo (Al Dahouk et al., 2007; Marianelli et al., 2007; García-Yoldi et al., 2007a; Kattar et al., 2008; Smits et al., 2009), na caracterização de novas espécies de *Brucella* e na avaliação de fontes de infecção humana (Marianelli et al., 2008; Scholz et al., 2008; Maquart et al., 2009). No Brasil, a genotipificação de 137 isolados de *Brucella abortus* pertencentes a várias regiões do país, utilizando o *MLVA 16*, encontrou 89 diferentes genótipos, considerados potenciais marcadores epidemiológicos espaciais (Minharro, 2009).

Assim, a técnica que emprega o *MLVA 16* apresenta grande potencial para auxiliar o PNCEBT no entendimento da cadeia de transmissão e vigilância epidemiológica da brucelose bovina, uma vez que, permite a rastreabilidade das fontes de infecção humana e animal e o estudo das relações genéticas dentro do gênero, principalmente das espécies de importância para a doença no país. Além disso, os dados gerados a partir deste trabalho podem contribuir para um maior conhecimento a respeito da estabilidade genética dos marcadores utilizados no *MLVA 16* frente à pressão de seleção que ocorre nas infecções naturais e, dessa forma, avaliar sua utilização na geoepidemiologia da brucelose bovina.

2.OBJETIVOS

i – Avaliar temporalmente a diversidade genotípica dos isolados de *Brucella abortus* provenientes de uma única propriedade;

ii – Avaliar a diversidade genotípica em função do espécime clínico a partir do qual se obteve o isolado de *Brucella abortus*;

iii – Avaliar a estabilidade dos marcadores que compõem o *MLVA 16* nas infecções naturais.

3.LITERATURA CONSULTADA

3.1.Brucelose bovina

A brucelose é uma enfermidade bacteriana causada por microrganismos do gênero *Brucella* e é uma importante zoonose de distribuição mundial que afeta diferentes espécies animais (Corbel, 1997). Também é conhecida como “febre ondulante”, “febre do Mediterrâneo” ou “febre de Malta”, e, no homem, a infecção é, quase invariavelmente, transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados ou seus produtos (Corbel et al., 2006). Aproximadamente 500.000 casos de brucelose humana são relatados anualmente à Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO/OMS*) (Pappas et al., 2006). Os sinais clínicos são inespecíficos, incluindo febre recorrente e bacteremia, além de infecções de tecidos linforeticulares (Pappas et al., 2006). Atualmente dez espécies de *Brucella* são reconhecidas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* e *B. inopinata* (Moreno et al., 2002; Scholz et al., 2008; Maquart et al., 2009; Scholz et al., 2010).

Os bovinos são os hospedeiros preferenciais de *B. abortus*, (Corbel et al., 2006), uma bactéria Gram-negativo e intracelular facultativa, cuja infecção em animais sexualmente maduros localiza-se principalmente no sistema reprodutivo e produz, tipicamente, placentite, seguida de aborto em fêmeas gestantes durante o último trimestre de gestação; e, epididimite e orquite nos machos (Silva et al., 2005; Corbel et al., 2006). As principais fontes de infecção na brucelose bovina são fetos abortados, placentas, anexos fetais e descargas uterinas eliminadas após o aborto ou no período pós-parto durante vários dias (Crawford et al., 1990; Lage et al., 2005). Infecções por *Brucella* spp ocorrem geralmente pela inalação ou

ingestão dos microrganismos através das cavidades nasal, oral e faríngea (Ko e Splitter, 2003).

B. abortus pode ser eliminada pelo leite de forma contínua ou intermitente durante a lactação, podendo causar mastite (Ray, 1979). Touros infectados eliminam *B. abortus* pelo sêmen, mas geralmente não transmitem a infecção pela monta natural. A utilização da inseminação artificial com sêmen contendo *B. abortus* virulentas torna o risco de infecção próximo a 100% (Nicoletti, 1986).

As perdas diretas decorrentes da brucelose bovina são causadas principalmente em função da ocorrência de abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerras, esterilidade, lesões piogranulomatosas em tecidos (articulações, tendões) e interrupção de linhagens genéticas (Acha e Szyfres, 1986). Além de levar à desvalorização da atividade, propriedades onde a doença está presente têm o valor comercial de seus animais e produtos depreciados, e países ou regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados, em decorrência da instalação de barreiras sanitárias ao comércio internacional, o que resulta em perdas econômicas significativas (Godfroid et al., 2005; OIE, 2008).

Estima-se que ocorra uma redução de 20 a 25% na produção de leite em função da interrupção da lactação por aborto ou período de serviço prolongado e perdas de 15% na produção de carne e bezerras. E, ainda, que a cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Acha e Szyfres, 1986).

No Brasil, a brucelose bovina devido a *B. abortus* é a mais preponderante (Poester et al., 2002) e encontra-se disseminada de modo heterogêneo em todo o território brasileiro, com prevalências de propriedades positivas que variam de 0,32% a 41,5% (Sikusawa et al., 2009; Chate et al., 2009). Os estados com prevalências mais elevadas estão localizados na região

Centro-Oeste do país e as frequências mais baixas, tanto de focos quanto de animais sororreagentes, são registradas na região Sul, sobretudo, no estado de Santa Catarina (Chate et al., 2009; Negreiros et al., 2009; Rocha et al., 2009; Sikusawa et al., 2009). Em Minas Gerais, Gonçalves et al. (2009) observaram de focos e de animais infectados de 6,0% e 1,1%, respectivamente.

Desde o seu lançamento, o programa brasileiro de controle e erradicação da brucelose bovina (PNCEBT) baseou-se na vacinação compulsória de bezerras com idade entre 3 e 8 meses com a cepa B19; na certificação voluntária de propriedades livres da brucelose bovina, em conformidade com as normas internacionais; na vacinação voluntária de bovinos adultos com RB51; na monitorização voluntária de bovinos de corte, com base em um esquema de amostragem periódica; no abate de animais positivos em frigoríficos; e, na formação de recursos humanos para atuar no programa (BRASIL, 2004).

Em 2007, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu as condições para a vacinação de fêmeas bovinas utilizando vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, amostra vacinal RB51, que deve ser usada para a imunização de fêmeas com idade superior a oito meses que não tenham sido vacinadas com a amostra B19 e de fêmeas adultas, não reagentes aos testes diagnósticos, em estabelecimentos de criação com focos de brucelose (BRASIL, 2007). A utilização desta amostra vacinal é proibida em bovinos machos de qualquer idade, em fêmeas até oito meses de idade e em fêmeas gestantes (BRASIL, 2007).

As medidas empregadas no controle da brucelose bovina são justificadas pela sua importância em saúde pública e pelas perdas econômicas que ocasiona e podem ser classificadas em duas principais categorias gerais: higiene e vacinação (Lage et al., 2005). A vacinação tem contribuído enormemente para o sucesso de muitos programas, especialmente, na fase de controle da doença (Olsen e

Stoffregen, 2005). A higiene cujo objetivo é limitar a exposição dos animais susceptíveis, inclui todos os processos, como o isolamento do agente, diagnóstico, restrição do comércio e abate dos animais positivos (Lage et al., 2005).

Entre as medidas mais eficazes na redução da prevalência e incidência da brucelose destaca-se a vacinação, que tem sido um componente crítico da maioria dos programas de controle ou erradicação dessa enfermidade em todo o mundo (Olsen e Stoffregen, 2005). As vacinas com melhores resultados na prevenção da brucelose são preparadas com cepas vivas atenuadas de *Brucella* spp. (Olsen e Stoffregen, 2005).

A *B. abortus* B19 foi a amostra vacinal mais usada para a prevenção da brucelose bovina por mais de seis décadas nos Estados Unidos, sendo ainda muito utilizada em diversos países, é um organismo liso atenuado que induz resposta sorológica que não pode ser diferenciada de respostas de anticorpos causadas por infecção com amostras selvagens. A virulência baixa e estável, além da imunogenicidade e antigenicidade relativamente elevadas são as características dessa estirpe que têm contribuído para o seu uso como vacina (Olsen e Stoffregen, 2005). A vacinação com B19 é uma medida extremamente importante e eficaz que pode ser usada como estratégia de controle da brucelose, mas tem a desvantagem de que seu uso pode confundir o diagnóstico por estimular a produção de anticorpos detectáveis por testes sorológicos (Corbel et al., 2006). Os títulos de anticorpos podem persistir por um período prolongado em uma pequena proporção de animais vacinados; e essa, aumenta com a idade em que é introduzida a vacinação (BRASIL, 2004). Para reduzir esse problema, a vacinação é geralmente realizada em animais jovens, com idade inferior a oito meses, podendo ser utilizada em adultos se uma dose reduzida é dada, sobretudo, pela via intraconjuntival (Corbel et al., 2006).

A estirpe de *B. abortus* RB51, derivada da estirpe virulenta *B. abortus* 2308, é uma amostra rugosa mutante deficiente do

lipolissacarídeo (LPS) O e tem sido empregada como uma alternativa à vacinação com B19. Sua principal vantagem é a não indução de anticorpos específicos anti-LPS ou anti-O, comumente detectados pelos testes sorológicos de rotina (Schurig et al., 1991). Esta característica permite que a vacinação com RB51 possa ser realizada em qualquer idade (BRASIL, 2007).

Bovinos vacinados com RB51 desencadeiam uma resposta imune celular contra *B. abortus* 2308 e são protegidos de abortos em desafios com 2308 de maneira similar ao que ocorre quando bovinos são vacinados com B19 (Stevens et al., 1995; Poester et al., 2006). Camundongos infectados com RB51 ou B19 exibem uma taxa de proliferação de linfócitos similar em resposta a proteínas de *B. abortus* 2308, entre 6 e 10 semanas pós-infecção, e RB51 contém muitos dos, se não todos os principais antígenos protéicos da linhagem parental 2308 que estimulam a proliferação dos linfócitos (Stevens et al., 1994a; Stevens et al., 1994b; Stevens et al., 1996). Células de linfonodos obtidas de bovinos vacinados com RB51 ou B19 exibem similar resposta proliferativa quando estimuladas com a amostra 2308 γ -irradiada e frações protéicas isoladas de 2308 (Stevens et al., 1995).

Antígenos de *B. abortus* acessam ambos os complexos principais de histocompatibilidade, I e II, para a apresentação de antígenos a linfócitos T CD8+ e CD4+, respectivamente (Wyckoff III, 2002). A resposta imunológica adaptativa é crítica para promover a função de memória, que tem papel chave na vacinação. As funções da resposta adaptativa do hospedeiro na brucelose podem ser classificadas em três principais mecanismos: produção de interferon-gama (IFN- γ) por linfócitos T CD8+, CD4+ e δ/γ , responsável por ativar as funções bactericidas dos macrófagos; citotoxicidade de células T CD8+ e δ/γ contra macrófagos infectados; e polarização da resposta para Th1 com produção de anticorpos das classes IgG2a e IgG3, capazes de opsonizar o patógeno e facilitar a sua fagocitose (Ko e Splitter, 2003).

3.2. Diagnóstico

A identificação adequada de animais infectados é um dos pilares dos programas desenvolvidos para o controle e/ou vigilância epidemiológica da brucelose bovina (Poester et al., 2005). O diagnóstico da brucelose bovina pode ser feito indiretamente, pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* (ELISA, soroaglutinação) ou pela identificação direta do agente (bacteriologia, imunohistoquímica, PCR).

A maioria dos testes diagnósticos para brucelose bovina baseia-se na detecção de anticorpos anti-cadeia O (Schurig et al., 2002) e não permitem a distinção entre anticorpos vacinais de anticorpos gerados na infecção natural. A detecção de anticorpos específicos no soro ou leite continua a ser o meio mais prático de diagnóstico da brucelose. O método mais eficiente e rentável é, geralmente, a triagem de todas as amostras usando um teste barato e rápido que é suficientemente sensível para detectar uma alta proporção de animais infectados (Corbel et al., 2006). Amostras positivas, à triagem, são, então, examinadas usando testes mais sofisticados e específicos e testes confirmatórios para o diagnóstico final (Corbel et al., 2006).

As provas sorológicas utilizadas pelo PNCEBT para diagnóstico da brucelose bovina são divididas em provas de triagem, como os testes de aglutinação com antígeno acidificado tamponado e o teste do anel em leite, ambos com elevada sensibilidade; e provas complementares ou confirmatórias como o teste de redução do 2-mercaptoetanol e o teste de fixação do complemento (BRASIL, 2004).

O teste do antígeno acidificado tamponado – AAT, também conhecido como teste de rosa bengala, é um teste de aglutinação simples no qual gotas de antígeno corado e soro são misturados e qualquer aglutinação significa uma reação positiva. É um teste qualitativo e excelente para ser usado como método de triagem, mas pode ser hipersensível para o diagnóstico em animais individuais, especialmente os vacinados (BRASIL, 2004).

No teste do anel do leite (TAL), uma gota de antígeno corado com hematoxilina é misturado com um pequeno volume de leite em um vidro ou tubo plástico. O método é simples e eficaz e, razoavelmente sensível, mas pode falhar ao detectar um pequeno número de animais infectados dentro de um grande rebanho (Nielsen, 2002).

O teste de soroaglutinação lenta em tubos – SAT, usado em paralelo com o teste de redução do 2-Mercaptoetanol, é amplamente utilizado para diagnóstico de brucelose e no PNCEBT é empregado como teste confirmatório (BRASIL, 2004). O teste de fixação do complemento (FC), também usado como teste confirmatório no diagnóstico de brucelose, é um método com sensibilidade e especificidade satisfatórias. No entanto, para a sua execução, necessita de instalações laboratoriais adequadas e de pessoal treinado, além da produção de vários imunorreagentes.

O Elisa indireto foi primeiramente desenvolvido para o diagnóstico da brucelose humana; oferece excelente sensibilidade e especificidade, além de ser um método robusto, de fácil execução e que emprega um mínimo de equipamentos e reagentes, todos prontamente disponíveis a partir de fontes comerciais. (Nielsen, 2002). O Elisa indireto não distingue entre anticorpos vacinais e aqueles gerados pela infecção; por isso foram desenvolvidos os testes de Elisa competitivo. Como teste de triagem, ambos são, geralmente, realizados em uma única diluição.

O teste de polarização fluorescente baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel e essa mesma molécula ligada ao anticorpo (Nielsen, 2000) e foi recentemente aprovado como método de diagnóstico confirmatório ou único para brucelose no PNCEBT (BRASIL, 2010).

O isolamento e identificação do agente são as técnicas de referência para o diagnóstico da brucelose (Poester et al., 2005). A identificação definitiva do microrganismo consome geralmente duas semanas e possui a vantagem de detectar o organismo de maneira direta (Corbel et al., 2006).

Durante o período em que o diagnóstico está sendo gerado, no entanto, muitas vezes a produção animal continua, assim como o processamento dos alimentos ou o paciente doente pode estar sendo tratado de forma incorreta (Bricker, 2002). Adicionalmente, os testes bacteriológicos necessitam de laboratórios especializados para serem realizados, possuem características subjetivas que requerem treinamento e experiência além de, oferecerem um potencial risco de infecção para quem os manipula (Bricker, 2002). O isolamento possui baixa sensibilidade principalmente para pacientes com infecção crônica (Matar et al., 1996).

A imuno-histoquímica é usada como técnica auxiliar nos estudos de patogenia e diagnóstico da brucelose bovina e possui como vantagem, além da observação direta do agente, a visualização das lesões por ele ocasionadas (Xavier et al., 2009). Também, não necessita da viabilidade do microrganismo e permite estudos retrospectivos.

Finalmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) também tem seu potencial, como ferramenta para o diagnóstico da brucelose, reconhecido; é altamente específica, sensível e facilmente adaptável a uma elevada demanda, o processo é rápido, simples e precisa de pouca manipulação (Bricker, 2002). Vários estudos (Fekete et al., 1990; Baily et al., 1992; Fekete et al., 1992; Romero et al., 1995; Leal-Klevezas et al., 1995; Matar et al., 1996; Bricker, 2002; Richtzenhain et al., 2002) demonstraram que a reação em cadeia da polimerase pode ser usada para a detecção do DNA de *Brucella* spp.

A PCR realizada diretamente de tecidos maternos e fetais, sangue, sêmen e leite tem sido desenvolvida por vários pesquisadores (Fekete et al. 1992; Romero et al. 1995; Leal-Klevezas et al., 1995; Queipo-Oturno et al., 1997; Amin et al., 2001; Richtzenhain et al., 2002). Além disso, técnicas derivadas da PCR, como as PCR multiplex AMOS (Bricker e Halling, 1994), AMOS-estendido (Bricker e Halling, 1995), AMOS-ERY-PCR (Ocampo-Sosa et al.,

2005) e Bruce-ladder PCR (López-Goñi et al., 2008), além da identificação das espécies de *Brucella* spp., permitem, ainda, a diferenciação entre amostras vacinais e de campo.

A PCR multiplex AMOS-estendido é capaz de identificar as espécies *B. abortus* (biovariedades 1, 2 e 4), *B. melitensis* (todas as biovariedades), *B. ovis*, *B. suis* (biovariedade 1), e as amostras vacinais de *B. abortus* B19 e RB51. Enquanto a PCR multiplex Bruce-ladder é capaz de identificar amostras de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* em todas as suas biovariedades, além das espécies *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti* e as amostras vacinais B19, RB51 e Rev1.

3.3. Epidemiologia molecular e número variável de repetições em Tandem (VNTR)

A epidemiologia molecular, integração das técnicas moleculares de tipificação e dos estudos epidemiológicos convencionais, possui valor muito significativo para a análise de infecções causadas por bactérias patogênicas e tem-se mostrado uma ferramenta auxiliar no monitoramento da propagação de infecções hospitalares, rastreamento de surtos de toxinfecções de origem alimentar, e no estudo de infecções veterinárias (Struelens, 1998). Os sistemas de tipificação são desenhados para discriminar amostras epidemiologicamente relacionadas de amostras não relacionadas de patógenos de interesse (vanBelkum et al., 2001).

Métodos de tipificação baseados em PCR exigem uma cuidadosa validação interna da reprodutibilidade e poder de discriminação (Struelens, 2002). Vários critérios são propostos para avaliar a performance dos sistemas de tipificação e incluem: tipificação, reprodutibilidade, estabilidade, capacidade discriminatória e concordância epidemiológica (Struelens, 1998). Na última década, muitos avanços tecnológicos foram alcançados, culminando em técnicas com alto poder de resolução. As principais técnicas de genotipificação e mais comumente utilizadas envolvem a análise

direta do DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism PCR – RFLP; Random Amplified Polymorphic DNA-PCR – RAPD; Multilocus Sequence Typing – MLST; Single Nucleotide Polymorphism – SNP; Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP; Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE, Variable Number of Tandem Repeat – VNTR*), permitindo grandes avanços na identificação, classificação, diagnóstico e nos estudos de evolução e filogenia, analisando uma parte ou a totalidade do genoma (Foxman et al., 2005; Li et al., 2009).

Neste contexto, o estudo dos números variáveis de repetições em tandem (*VNTR*) foi fundamental ao estudo e à construção de mapas genéticos de vários mamíferos e, ainda, são a base das aplicações forenses de tecnologias associadas ao DNA (Vergnaud e Denoeud, 2000; Al Dahouk et al., 2007). A técnica baseia-se no polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados a partir do genoma dos organismos comparados (Vergnaud e Pourcel, 2006).

VNTR consistem em ocorrências consecutivas perfeitas ou imperfeitas de uma unidade de repetição de DNA e vários alelos podem ser observados entre amostras de um mesmo microrganismo. São encontrados em todos os organismos procariotos, bem como em eucariotos, sendo, geralmente, classificados em: satélites, que medem megabases de DNA; minisatélites, unidades de repetição na faixa de 100-600 pb, abrangendo centenas de pares de bases; e microsátélites, unidades de repetição de intervalo entre 1-8 pb, abrangendo algumas dezenas de nucleotídeos (Vergnaud e Pourcel, 2006; Grissa et al., 2007). O reconhecimento do conjunto de *loci*, altamente polimórficos, que se repetem muitas vezes, é mais de 20 anos (Versalovic et al., 1991). No final da década de 1980, com o advento da tecnologia de amplificação do DNA *in vitro* (PCR), grupos de pesquisadores começaram a desenvolver os primeiros rascunhos do mapa genético humano, caracterizando os assim chamados polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (*RFLP*), que se baseavam essencialmente

na tipificação de microssatélites (Li et al., 2009).

Repetições em tandem também foram identificados em procariotos durante os anos de 1980 e o polimorfismo associado a alguns genes específicos foi descrito (Lupski e Weinstock, 1992). O estudo de Múltiplos *Loci* de *VNTR* (*Multiple Locus VNTR Analysis – MLVA*) mostrou-se promissor na tipificação de bactérias utilizando-se o *Southern blotting* e a hibridização com sondas ricas em GC, ou mesmo uma sonda de oligonucleotídeos, como havia sido feito, até então, para humanos. No entanto, foi a disponibilidade em grande escala de dados de sequenciamento que abriu caminho para o *MLVA* baseado em PCR (Vergnaud e Pourcel, 2006). O método foi aplicado, inicialmente, para o *Haemophilus influenzae*. Entretanto, segundo vanBelkum et al. (1997), como nem todas as espécies de bactérias são igualmente passíveis de tipificação pelo *MLVA*, o primeiro passo é avaliar o potencial da técnica para a espécie de interesse.

A função biológica e o mecanismo evolutivo associados aos *VNTR* não estão totalmente compreendidos, apesar de suas diversas aplicações práticas na identificação, ecologia e filogenia bacteriana (Vergnaud e Denoeud, 2000). De modo semelhante, o processo de mutação relacionado às repetições em tandem ainda não foi precisamente elucidado, mas parece provável que seja independente dos outros processos mencionados, uma vez que não há correlação entre os índices (Grissa et al., 2008).

Em um ensaio *MLVA* típico, alguns, não mais que vinte *VNTR*, distribuídos por todo o genoma bacteriano, são analisados e um código correspondente ao número de repetições em cada *locus* é determinado. Este código é facilmente armazenado em bases de dados e pode ser usado para o agrupamento de amostras e em estudos epidemiológicos (Vergnaud e Pourcel, 2006). O número de unidades de repetição encontrado em cada *VNTR* pode ser determinado em resolução mais baixa, em gel de agarose corado com brometo de

etídeo; assim o ensaio pode então ser executado com equipamento muito simples e com custo baixo em termos de materiais de consumo e equipamentos. A máxima resolução significa que o método usado deve ser capaz de resolver com confiança diferentes produtos de PCR por uma unidade de repetição. O número de unidades de repetição é determinado com o auxílio de *softwares*, a partir da estimativa do tamanho do fragmento de PCR encontrado para o alelo. Este cálculo é mais difícil quanto mais curto é a unidade de repetição ou quanto mais longo for o fragmento.

Um gel de agarose *MLVA* típico é composto por um controle (amostra com um número de repetições conhecido para o *locus*) e um marcador de tamanho molecular, cada um deles colocado um número de vezes em cada gel (geralmente 4-7 vezes, dependendo do tamanho do gel), a fim de ser capaz de levar em conta e compensar as variações intra e intereletroforese (Vergnaud e Pourcel, 2006). Utilizando fluorescência com cores diferentes para cada amplicom, é possível separar os fragmentos por eletroforese capilar em um sistema automatizado com sequenciador; assim, o *MLVA* pode ser realizado em um único tubo de PCR (PCR multiplex), o que melhora drasticamente a sua eficiência e automatização (Lindstedt, 2005).

As informações geradas a partir da análise de um painel de *VNTR* (*MLVA*) para cada isolado bacteriano de determinada espécie podem ser depositadas na internet de maneira a constituir um banco de dados universal, que permita o intercâmbio de informações entre grupos de pesquisa, estudos epidemiológicos mais abrangentes e o agrupamentos de amostras. Ainda, no caso de algumas espécies de bactérias altamente monomórficas, como *Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*, a utilização do método de tipificação por *VNTR* é a técnica de escolha para a definição de subespécies (Li et al. 2009). Além do fato de que esses *loci* representam uma importante fração do polimorfismo existente, eles oferecem inúmeras vantagens práticas, incluindo a

facilidade de execução e intercâmbio de dados entre os diferentes países.

Mais recentemente, estudos têm apoiado a noção de que o conjunto de mini e microsátélites é, provavelmente, uma fonte muito importante de muitos marcadores informativos, capazes de auxiliar na identificação de organismos patogênicos, mesmo quando esses patógenos emergiram recentemente. Isso provavelmente reflete a importante contribuição das repetições em tandem à adaptação do patógeno ao seu hospedeiro. Repetições em tandem parecem contribuir de duas maneiras, pelo menos, para a variação fenotípica em bactérias. *VNTR* localizados na região reguladora de um gene pode constituir uma chave liga / desliga da expressão do gene em nível transcricional. Embora sejam de alta resolução, *loci* com *VNTR* podem evoluir muito rapidamente para fornecer confiança em relações filogenéticas entre as cepas intimamente relacionadas (Li et al., 2009).

O *MLVA* tem sido utilizado na genotipificação de diversos microrganismos incluindo: *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Brucella* spp. e *Legionella pneumophila* (Frothingham e Meeker-O'Connell, 1998; Keim et al., 2000; Le Flèche et al., 2001; Lindstedt et al., 2003; Bricker et al., 2003; Pourcel et al., 2003); principalmente em decorrência da facilidade do ensaio, baixo custo e reprodutibilidade. Métodos de genotipificação são cada vez mais uma parte integrante de ambos, laboratórios de microbiologia clínica e de investigação. Curiosamente, uma fração significativa das investigações está relacionada a patógenos que apresentam potencial como agentes de guerra biológica.

3.4. Análise de múltiplos *loci* de *VNTR* (*MLVA*)

O gênero *Brucella* é altamente homogêneo, possui mais de 90% de homologia DNA/DNA (Verger et al., 1985), aspecto que restringe a utilização de técnicas moleculares com objetivo de subtipar o gênero (LeFlèche et al., 2006). A

caracterização genética de patógenos permite o estudo de relações epidemiológicas entre isolados, contribui para a taxonomia do microrganismo, além de explorar o impacto da diversidade genética sobre importantes parâmetros bioquímicos, como virulência ou resistência a drogas (Tybayrenc, 1998).

Recentemente, o genoma de *B. melitensis* 16M (DelVecchio et al., 2002), *B. suis* 1330 (Paulsen et al., 2002) e *B. abortus* 9-941 (Halling et al., 2005) foram completamente sequenciados. Estes dados possibilitaram a identificação de sequências de DNA variáveis com potencial utilização como marcadores para o diagnóstico e diferenciação genotípica (Bricker et al., 2003). Assim, 107 *loci* com repetições em tandem de pelo menos 5bp foram observados no genomas acima citados e, oitenta destes tiveram o polimorfismo avaliado entre 21 amostras de referência e isolados de *Brucella* spp. de mamíferos marinhos (Le Flèche et al., 2006). Um conjunto de 15 *loci*, os quais preservaram o agrupamento das amostras e conseguiram uma discriminação satisfatória foram selecionados e investigados frente a uma coleção de 236 isolados, constituída pelos principais biovares que afetam os mamíferos terrestres (Le Flèche et al., 2006). O então proposto *MLVA 15*, composto por oito marcadores de minisatélites (painel 1) e sete marcadores de microsatélites altamente discriminatórios (painel 2), foi posteriormente adicionado do *locus* 19 (minisatélite) no painel 2 (Al Dahouk et al., 2007), passando a ser conhecido com *MLVA 16*. Além das espécies clássicas de *Brucella* spp., o *MLVA 16* é capaz de caracterizar as novas espécies *B. microti* e *B. inopinata*; ambas apresentam um padrão de agrupamento distante das espécies conhecidas (Scholz et al., 2008; Scholz et al. 2010).

Esta técnica tem provado ser altamente discriminatória, tanto para isolados provenientes de infecções humanas (Al Dahouk et al., 2007; Marianelli et al., 2007; Kattar et al., 2008) quanto de infecções animais (Le Flèche et al., 2006; Whatmore et al., 2006; García-Yoldi et al., 2007a).

Maquart et al. (2009) também mostraram que o *MLVA 16* é uma ferramenta muito útil para a classificação molecular de amostras de mamíferos marinhos, permitindo a tipificação de uma grande população, enquanto fornece um agrupamento de acordo com todos outros métodos relatados, juntamente com um maior poder discriminatório.

A análise de múltiplos *loci* com *VNTR*, o *MLVA*, além de apresentar alta capacidade discriminatória, também exibe excelente reprodutibilidade. Kattar et al. (2008) encontraram 100% de concordância entre resultados obtidos em um laboratório na França e outro no Líbano para as mesmas amostras, utilizando o mesmo protocolo.

O *MLVA 16* tem sido empregado de maneira abrangente em estudos epidemiológicos sobre brucelose no mundo. Kattar et al. (2008) estabeleceram uma fonte de infecção comum a partir da análise epidemiológica entre isolados com o mesmo perfil genotípico. Marianelli et al. (2008) confirmaram que a infecção de um técnico foi adquirida no laboratório pela análise do perfil genotípico, dessa forma, a tipificação através de análise de *VNTR* pode ajudar a diferenciar acidentes laboratórios de infecções adquiradas durante o lazer ou viagem a um país endêmico.

Da mesma forma, usando métodos clássicos de tipificação há grande dificuldade em diferenciar uma nova infecção de recidiva da doença; nestes casos, é necessário modificar o tratamento; entretanto, se for uma nova infecção o tratamento padrão pode ser seguido (Al Dahouk et al., 2007). Smits et al. (2009) utilizando o *MLVA 16* para genotipificar isolados obtidos de pacientes hospitalizados em Lima, Peru, confirmaram a re-infecção em três pacientes e recidiva da doença clínica em um paciente.

No Brasil, Minharro (2009), utilizando o *MLVA 16*, encontrou 89 diferentes genótipos para 137 isolados de *Brucella abortus* pertencentes a várias regiões do país, considerados potenciais marcadores epidemiológicos espaciais. A possível

utilização destes genótipos como marcadores epidemiológicos está relacionada à sua estabilidade frente à pressão de seleção que ocorre nas infecções naturais. A estabilidade deve ser suficiente para que isolados epidemiologicamente relacionados apresentem uma alta homologia genotípica.

Avaliações da estabilidade genética *in vitro* de amostras vacinais de *B. abortus* B19 e RB51 (Faria, 2010) e de *B. melitensis* Rev. 1 (García-Yoldi et al., 2007b) mostraram grande estabilidade dos marcadores genéticos que compõem o *MLVA 16* e *MLVA 15*, respectivamente. Em ambos os estudos, a variabilidade entre as amostras vacinais avaliadas foi pequena e restrita aos marcadores Bruce 07, 09, 16 e 18, relacionados ao alto poder discriminatório da técnica, sugerindo que o *MLVA* seja incluído entre os testes utilizados para garantir a qualidade e estabilidade genética das vacinas vivas anti-*Brucella* (García-Yoldi et al., 2007b; Miranda, 2009; Faria, 2010).

Todavia, pouco ainda é conhecido a respeito da estabilidade genética dos marcadores usados no *MLVA 16* em infecções naturais. Whatmore et al. (2006) também avaliaram a estabilidade genética de marcadores de *VNTR* pela passagem *in vitro* de culturas de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* por aproximadamente 10 meses e pela passagem *in vivo* de *B. suis* 01-5744 em suínos com avaliações até os 113 dias pós-infecção. Estes autores concluíram que a metodologia de cultivo *in vitro* de isolados não induzir mudanças significativas no perfil genotípico das amostras. E sugerem, ainda, que as variações entre os isolados de *B. suis*, obtidos a partir da passagem *in vivo*, são pontuais e não inviabilizam a associação das amostras como intimamente relacionadas.

O *MLVA 16* satisfaz a maioria dos critérios de desempenho recomendados a um teste de tipificação: reprodutibilidade, estabilidade, capacidade discriminatória e concordância epidemiológica (Bricker e Ewalt, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O experimento foi conduzido em uma propriedade leiteira do estado de Minas Gerais com foco de brucelose. A propriedade utilizada no estudo possui aproximadamente 500 vacas em lactação de vários graus de sangue holandês/Gir, em sistema semi-intensivo com três ordenhas diárias. O rebanho não é fechado, ou seja, realiza compra e venda de animais, faz recria somente das fêmeas e utiliza inseminação artificial.

Suspeitou-se de brucelose no rebanho em decorrência da alta taxa de aborto (15%) observada ao final de 2008. Exames realizados em março de 2009 confirmaram a suspeita e a partir deste momento testes sorológicos para diagnóstico da brucelose bovina começaram a ser realizados mensalmente em todos os machos (rufiões) e fêmeas com idade superior a 24 meses. A prova do antígeno acidificado tamponado foi usada como teste de triagem e o teste de redução do 2-Mercaptoetanol como exame confirmatório conforme recomendação do PNCEBT. Todos os animais reagentes a cada teste foram prontamente eliminados do rebanho. Outra medida empregada para o saneamento da propriedade foi a vacinação de todas as fêmeas com idade superior a oito meses, inclusive as gestantes, com a amostra vacinal RB51 em duas datas 30.05.2009 e 02.12.2009. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG – Protocolo 139/10).

4.2. Coleta das amostras

Duzentas e sessenta e uma amostras clínicas de bovinos, 161 amostras de suabes vaginais e 100 amostras de leite. O suabe vaginal foi coletado de todas as vacas do rebanho no pós-parto ou pós-aborto imediato em meio Stuart entre janeiro de 2009 e fevereiro de 2010. Leite de todas as vacas que 57 dias após a primeira vacinação com RB51 apresentavam 60 dias

ou menos do acontecimento do último parto ou aborto foi coletado. Todas as amostras de leite foram coletadas em um único dia, de cada animal foi colhido um total de 50mL de leite, descartando-se sempre o primeiro jato, em recipientes plásticos de fundo cônico estéreis.

Os suabes vaginais e as amostras de leite foram identificados individualmente com o número do animal e mantidos refrigerados até sua chegada ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – LBA/EV/UFMG. Os suabes vaginais eram remetidos mensalmente ao LBA/EV/UFMG, e assim como as amostras de leite eram armazenados -20°C até o processamento laboratorial, sempre por um período inferior a 30 dias.

4.3. Isolamento

As amostras de leite foram descongeladas e centrifugadas a 2.500 x g, durante 15 minutos a 18°C. Para cada amostra, a fase intermediária foi descartada e o sobrenadante, misturado ao sedimento. A partir de cada mistura, 100µL foram imediatamente inoculados, em duplicata, em placas de ágar triptose (Difco, EUA) suplementado com antibióticos (suplemento Farrell) (Oxoid, UK) e 1,0mL foi diluído em 9,0mL de meio de enriquecimento (caldo de triptose com suplemento seletivo Farrell) (Alton et al., 1988). Os suabes vaginais foram descongelados e diretamente plaqueados, em duplicatas, em ágar triptose (Difco, EUA) com antibióticos (suplemento Farrell) (Oxoid, UK), em duplicatas (Alton et al., 1988) e inoculados em 10mL de meio de enriquecimento (caldo de triptose com suplemento seletivo Farrell)

Os meios de enriquecimentos inoculados com leite ou suabe vaginal foram incubado a 37°C, por sete dias em atmosfera com 5% de CO₂ e, em seguida, inoculado em ágar triptose com antibióticos (Minharro, 2009). Todas as placas foram incubadas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C por 14 dias. O crescimento de colônias com morfologia sugestiva de *Brucella* spp. foi verificado diariamente (Alton et al., 1988).

O processamento dos espécimes clínicos assim como o isolamento de colônias sugestivas de *Brucella* spp. foi realizado em laboratório de biossegurança nível 3 (NBS III) - Escola de Veterinária da UFMG.

4.4. Biotipificação

Os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Brucella* baseado na morfologia colonial, positividade aos testes de urease, catalase e redução do nitrato; resultado negativo aos testes de motilidade, utilização do citrato e indol. A classificação em espécie e biovariedade foi realizada pelos testes de produção de H₂S, aglutinação em acriflavina, requerimento de CO₂ e sensibilidade aos corantes tionina (20µg/mL e 40µg/mL) e fucsina básica (20µg/mL). Os testes bioquímicos foram realizados empregando-se como controle para os ensaios as amostras de referência descritas na tabela 1 segundo Alton et al. (1988).

4.5. Obtenção do DNA genômico

Colônias características de *Brucella* spp. foram ressuspendidas em 100 µL de tampão Tris EDTA (TE -Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), inativadas a 85°C por 2h e submetidas à extração do DNA genômico segundo Pitcher et al. (1989). A verificação da pureza e determinação da concentração do DNA das amostras foi feita por espectrofotometria (Sambrook et al., 1989). A concentração de DNA para todos os isolados foi padronizada em 50ng/µL.

4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) gênero-específica

Para confirmar o identificação, DNA de cada isolado foi submetido à PCR para amplificação do gene *bcsp31*, conservado em todas as espécies de *Brucella*, utilizando os iniciadores B4 e B5 descritos por Bailly et al. (1992). A amplificação do DNA genômico de cada amostra foi realizada como descrito por Richtzenhain et al. (2002). Controles positivos usando a amostra de referência *B. abortus* 544 (ATCC 23448) e controles negativos contendo

todos os reagentes do mix de PCR sem o DNA foram empregados, rotineiramente, em cada experimento.

A visualização dos produtos amplificados em todas as reações de PCR foi feita em gel de agarose a 1,0% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) (89mM Tris Base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA) e corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Seguida a eletroforese, os géis foram observados à luz ultravioleta e fotografados (L-PIX EX, Locus Biotecnologia, Brasil). O marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado em cada eletroforese.

4.7. PCR espécie específica

Os ensaios de PCR multiplex AMOS-estendido (Bricker e Halling, 1995) e Bruce-ladder (López-Goñi et al., 2008) foram utilizados para confirmar a espécie de *Brucella* envolvida nas infecções naturais. Os ensaios de PCR no formato multiplex foram utilizados na seguinte sequência: primeiro, as amostras foram submetidas à PCR multiplex AMOS-estendido que é capaz de identificar as espécies *B. abortus* (biovariedades 1, 2 e 4), *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* (biovariedade 1), e as amostras vacinais de *B. abortus* B19 e RB51; se este ensaio não fornecesse uma confirmação definitiva da espécie procedia-se então a PCR multiplex Bruce-Ladder.

As condições de amplificação e ciclos da reação empregados foram idênticos aos descritos por Bricker e Halling (1995) para a PCR multiplex AMOS-estendido e por López-Goñi et al. (2008) para a PCR multiplex Bruce-Ladder. Controles positivos usando o DNA das amostras de referência de *Brucella* descritas na tabela-1 e controles negativos contendo todos os reagentes sem o DNA foram empregados rotineiramente em todas as reações.

A visualização dos produtos amplificados em todas as reações de PCR foi feita em gel de agarose 1,0% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 89mM Tris Base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA) corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL).

Seguida a eletroforese, os géis foram observados sob luz ultravioleta e fotografados (L-PIX EX, Locus Biotecnologia, Brasil). Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado em cada eletroforese.

4.8. Análise de múltiplos loci de VNTR (MLVA 16)

Para determinar a diversidade genética dos isolados de *Brucella* spp., o DNA de cada amostra foi analisado pela técnica de análise de múltiplos loci de VNTR (MLVA 16) conforme descrito por Le Flèche et al. (2006) e, posteriormente, adaptado por Al Dahouk et al. (2007).

Foram utilizados 16 iniciadores (Tabela 2), para diferentes loci de VNTR de *Brucella* spp. (MLVA 16) (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007), divididos em três painéis (Tabela 2).

As reações de PCR foram feitas com um volume final de 12 µL contendo: tampão (50mM Tris, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 50mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3); 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 1µM de cada iniciador; 1,5mM de MgCl₂; 1 unidade de DNA polimerase e 50ng de DNA. As amplificações foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para as amplificações do locus Bruce06 foi adicionado 1M de betaina (Sigma, EUA) na reação de PCR.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para o painel A e a 3% para os painéis 2A e 2B, em tampão Tris-borato-EDTA 1X (TBE) (89mM Tris Base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA). Os géis obtidos foram corados com brometo de etídeo (0,5mg/mL), visualizados sob luz ultravioleta (UV) e fotografados (L-PIX EX, Locus Biotecnologia, Brasil). Marcadores de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England, EUA) e 25 bp Step Ladder (Promega, EUA) foram utilizados nas

eletroforeses de acordo com a unidade de repetição de cada *locus*. A amostra de *B. melitensis* 16M (ATCC 23456) foi usada como controle em todas as eletroforeses dos painéis 2A e 2B.

4.9. Análise dos genótipos

A partir da imagem digital de cada gel, estimou-se o tamanho dos fragmentos encontrados para cada amostra, em cada *locus* do *MLVA 16*, com o auxílio do

programa BioNumerics 6.0 (Applied Maths, Bélgica). O tamanho estimado para cada banda foi, então, convertido para o número de unidades de repetições para o respectivo *loci*, segundo Le Flèche et al. (2006). Os genótipos foram gerados a partir da associação do número de repetições encontrados em cada um dos *locus* dos painéis 1, 2A e 2B, e comparados aos depositados no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>).

Tabela 1 – Amostras de referência usadas no estudo como controles nos ensaios de identificação, biotipificação e PCR

Espécie	Biovariedade	Amostra
<i>B. abortus</i>	1	544 = ATCC 23448
<i>B. abortus</i>	1	B19 = USDA
<i>B. abortus</i>	1	RB51
<i>B. abortus</i>	3	Tulya = ATCC 23450
<i>B. abortus</i>	4	292 = ATCC 23451
<i>B. abortus</i>	6	870 = ATCC 23453
<i>B. abortus</i>	9	C68 = ATCC 23455
<i>B. melitensis</i>	1	16M = ATCC 23456
<i>B. suis</i>	1	1330 = ATCC 23444
<i>B. ovis</i>	-	Reo 198
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	ATCC 29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	ATCC 19115
<i>Salmonella entérica Typhimurium</i>	-	ATCC 14028

Tabela 2 – Iniciadores utilizados nos painéis 1, 2A e 2B do *MLVA 16*

Locus	Iniciadores	Painel	Un. de repetição
Bruce06	5'ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG3' 5'GCGTGACAATCGACTTTTTGTC3'	1	134bp
Bruce08	5'ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC3' 5'ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC3'	1	18bp
Bruce11	5'CTGTTGATCTGACCTTGCAACC3' 5'CCAGACAACAACCTACGTCCTG3'	1	63bp
Bruce12	5'CGGTAATCAATTGTCCCATGA3' 5'GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC3'	1	15bp
Bruce42	5'CATCGCCTCAACTATAACCGTCA3' 5'ACCGCAAATTTACGCATCG3'	1	125bp
Bruce43	5'CATCGCCTCAACTATAACCGTCA3' 5'ACCGCAAATTTACGCATCG3'	1	12bp
Bruce45	5'ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG-3' 5'CGGGTAAATATCAATGGCTTGG3'	1	18bp
Bruce55	5'TCAGGCTGTTTCGTCAGTCTT'-3 5'AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT3'	1	40bp
Bruce18	5'TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT3' 5'GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG3'	2A	8bp
Bruce19	5'GACGACCCGGACCATGCTT3' 5'ACTTCAACCGTAACGTCGTGGAT3'	2A	6bp
Bruce21	5'CTCATGCGCAACCAAAACA-3' 5'ATCTCGTGGTCGATAATCTCATT3'	2A	8bp
Bruce04	5'TGACGAAGGGAAGGCAATAAG3' 5'CGATCTGGAGATTATCGGGAAG3'	2B	8bp
Bruce07	5'GCTGACGGGGAAGAACATCTAT3' 5'ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAA3'	2B	8bp
Bruce09	5'GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC3' 5'GGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG3'	2B	8bp
Bruce16	5'ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT-3' 5'GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT3'	2B	8bp
Bruce30	5'TGACCGCAAACCATATCCTTC3' 5'TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG3'	2B	8bp

Fonte: Adaptado de LèFleche et al., (2006).

5.RESULTADOS

5.1.Sorologia

As prevalências de animais positivos na propriedade entre maio de 2009 e novembro de 2010 estão mostradas na Figura 1.

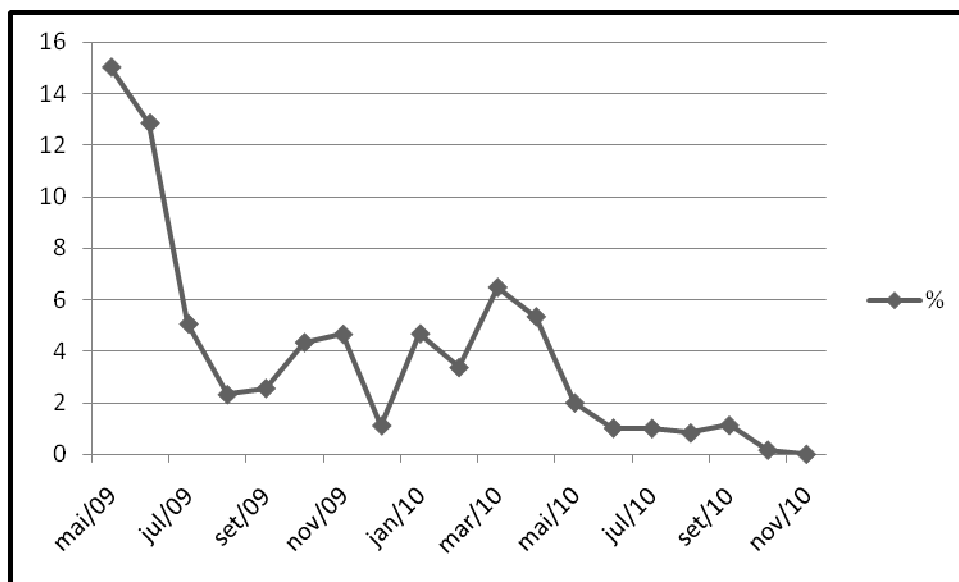


Figura 1 – Incidência de animais positivos para brucelose no foco estudado entre maio de 2009 e novembro de 2010.

5.2.Isolamento e Identificação

Vinte e oito isolados de *B. abortus* foram obtidos a partir dos materiais clínicos oriundos do foco de brucelose, vinte e um isolados [13,04%(21/161)] foram obtidos a partir de suabes vaginais de vacas no pós-parto ou pós-aborto e sete [7,00%(7/100)] a partir de leite de animais até 60 dias pós-parto ou pós-aborto (Tabela 3).

À bioquímica e biotipificação dezoito isolados foram classificados como biovariedade 3 e dez como biovariedade 1, todos de *B. abortus* (Tabela 3). Dentre os dez isolados de *B. abortus* biovariedade 1, nove apresentaram colônias rugosas e um colônias lisas.

As colônias isoladas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Brucella* pela técnica de PCR descrita por Baily et al. (1992) (Figura 2); e como *Brucella abortus*, pelas técnicas de PCR multiplex AMOS-estendido e Bruce-ladder descritos por Bricker e Halling (1995) (Figura 3) e López-Goñi et al. (2008) (Figura 4), respectivamente. Nove isolados de *B. abortus*, obtidos a partir de suabes vaginais, foram confirmados como RB51 pela PCR multiplex AMOS-estendido (Figura 3) (Tabela 3). Dezenove isolados, sete obtidos a partir de amostras de leite e doze a partir de suabes vaginais, foram confirmados como *B. abortus* amostra selvagem pela PCR multiplex Bruce-ladder (Figura 4).

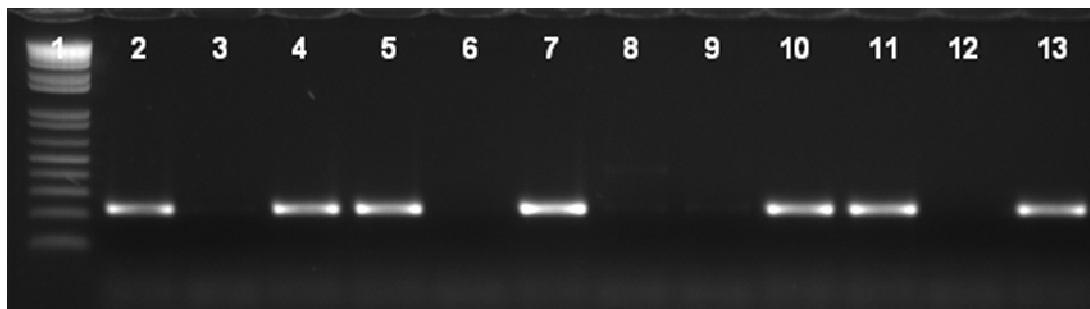


Figura 2 – Gel de agarose a 1% mostrando amplificação pela PCR gênero-específica para *Brucella* spp. corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); canaletas 2, 4, 5, 7, 10 e 11: isolados pertencentes ao gênero *Brucella*; canaletas 3, 6, 8 e 9: isolados com resultado negativo à PCR gênero-específica; canaleta 12: controle negativo; canaleta 13: amostra de referência 544.

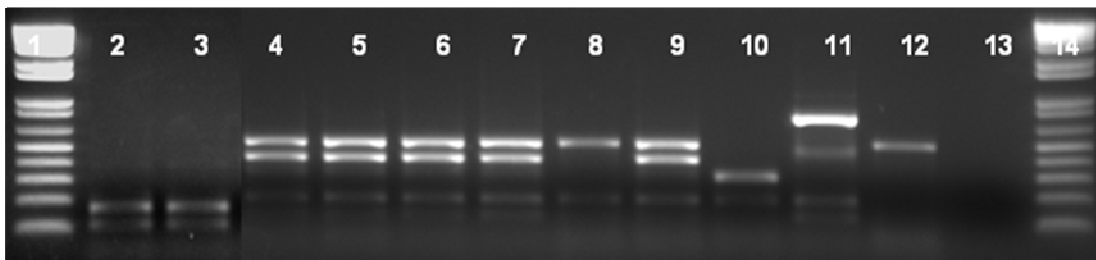


Figura 3 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação da PCR multiplex AMOS-estendido corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 1 e 14: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA); canaleta 2 e 3: isolados de *Brucella* spp. sem identificação de espécie na PCR multiplex AMOS-estendido; canaletas de 4 a 7: isolados identificados como *B. abortus* amostra vacinal RB51; canaleta 8: *B. abortus* 544; canaleta 9: RB51; canaleta 10: *B. suis* 1330; canaleta 11: *B. melitensis* 16M; canaleta 12: B19; canaleta 13: controle negativo.

Tabela 3 – Resultado da identificação e genotipificação dos isolados de *B. abortus* em um foco de brucelose

Isolado N° LBA	Material Clínico	Data da Coleta	Identificação	Biovariedade	Amostra vacinal	Genótipo	Sinal Clínico
2558	Suabe vaginal	03/07/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
1379	Suabe vaginal	04/07/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
2251	Suabe vaginal	11/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2496	Suabe vaginal	11/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
1365	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Natimorto
2476	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2598	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Natimorto
2683	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2785	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2965	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2980	Leite	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
3159	Suabe vaginal	27/07/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
2608	Suabe vaginal	03/08/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
2922	Suabe vaginal	18/08/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
3169	Suabe vaginal	21/08/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
1414	Suabe vaginal	01/09/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Aborto
2757	Suabe vaginal	01/09/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
2985	Suabe vaginal	01/09/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2575	Suabe vaginal	02/09/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2700	Suabe vaginal	11/09/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Aborto
2545	Suabe vaginal	19/09/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Natimorto
3144	Suabe vaginal	01/10/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
3136	Suabe vaginal	05/10/2009	<i>B. abortus</i>	1	RB51	C	Nenhum
2634	Suabe vaginal	07/10/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Aborto
2595	Suabe vaginal	17/10/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
1198	Suabe vaginal	28/10/2009	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Aborto
2588	Suabe vaginal	28/01/2010	<i>B. abortus</i>	3	-	A	Nenhum
2774	Suabe vaginal	06/02/2010	<i>B. abortus</i>	1	-	B	Nenhum

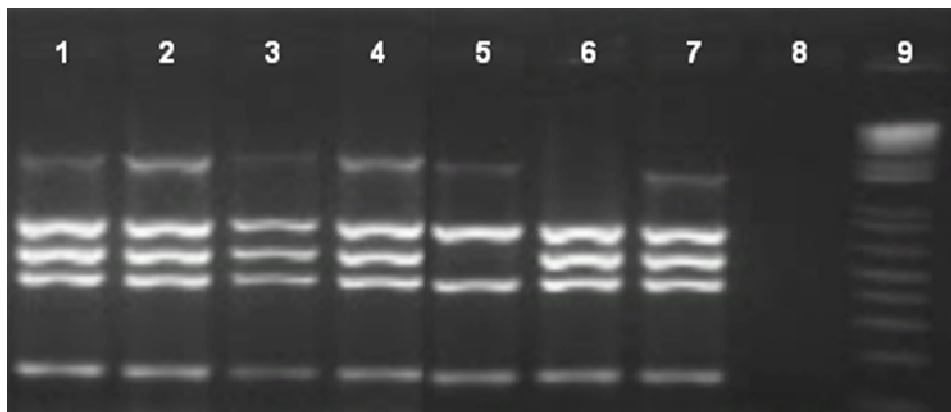


Figura 4 – Gel de agarose a 1% mostrando a amplificação da PCR multiplex Bruce-ladder corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaletas 1 a 4: isolados identificados como *B. abortus*; canaleta 5: B19; canaleta 6: RB51; canaleta 7: *B. abortus* 544; canaleta 8: controle negativo; canaleta 9: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

5.3.MLVA 16

A análise das imagens digitais obtidas a partir da eletroforese dos painéis 1, 2A e 2B (Figura 5 e 6) revelou a existência de três genótipos distintos (A, B e C) entre as amostras *B. abortus* isoladas do foco (Tabela 3 e 4). Em todos os dezoito isolados identificados como *B. abortus* biovariedade 3 foi observado o mesmo perfil genotípico, A. O genótipo B foi observado apenas em um único isolado, identificado como *B. abortus* biovariedade 1 amostra selvagem. Finalmente, o genótipo C foi encontrado somente nas nove amostras classificadas com *B. abortus* RB51 (Tabelas 3 e 4).

O perfil genotípico B, encontrado somente em um isolado, difere do genótipo A nos *loci* Bruce04, Bruce06, Bruce11, Bruce16, Bruce 18 e Bruce30. Nos *loci* Bruce06, Bruce11, Bruce16 e Bruce30 a diferença ocorre pela adição de uma, uma, duas e três unidades de repetição, respectivamente. Já nos *loci* Bruce04 e Bruce18 as diferenças ocorrem pela deleção de duas e uma unidades de repetição, respectivamente (Tabela 4). Quando comparado ao perfil genotípico C, o genótipo B possui distintos números de unidades de repetição nos *VNTR*: Bruce07, Bruce16, Bruce30 e Bruce43; as diferenças são ocasionadas pela adição de três, duas e

uma unidade e pela deleção de uma unidade de repetição, respectivamente.

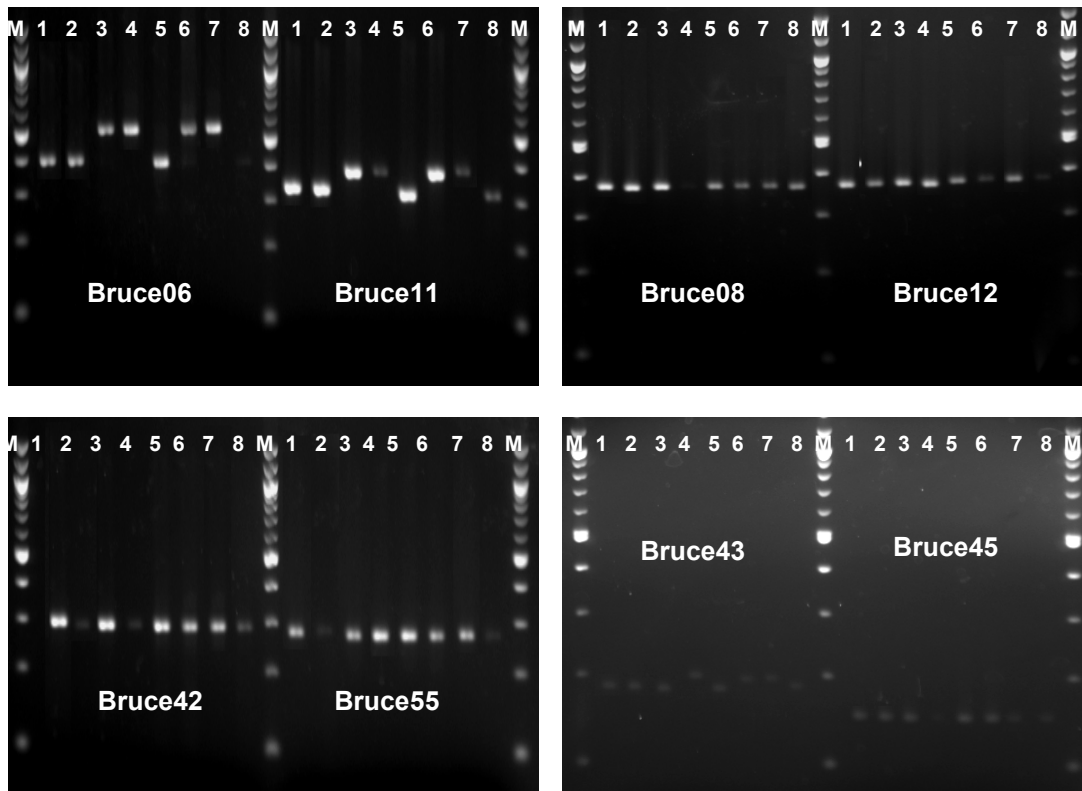


Figura 5 – Gel de agarose a 2% mostrando a amplificação do painel 1 do MLVA 16 (Bruce 06, 08, 11, 12, 42, 43, 45 e 55) de oito isolados de *B. abortus* oriundos de um único foco de brucelose corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaletas 1, 2, 5 e 8: perfil genotípico A; Canaleta 3: perfil genotípico B; Canaletas 4, 6 e 7: perfil genotípico C; M: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England, EUA).

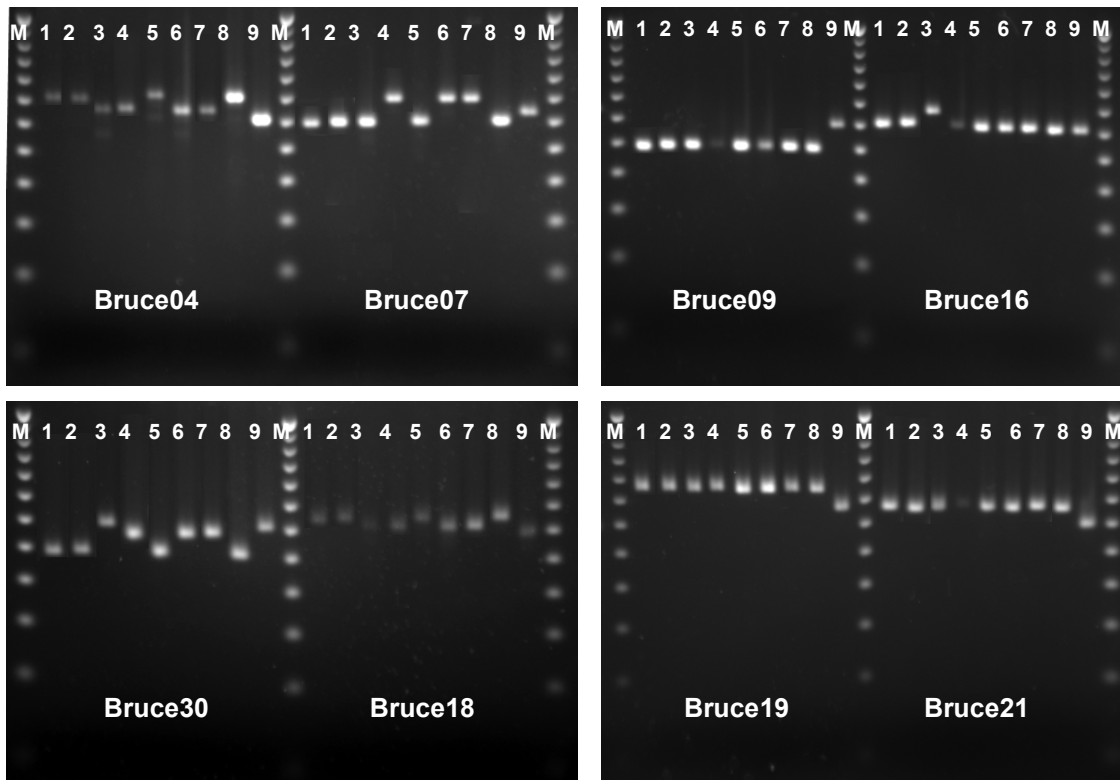


Figura 6 – Gel de agarose 3% mostrando a amplificação dos painéis 2A (Bruce 18, 19 e 21) e 2B (Bruce 04, 07, 09, 16 e 30) do MLVA 16 de oito isolados de *B. abortus* oriundos de um único foco de brucelose corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL). Canaleta 3: perfil genotípico B; Canaletas: 4, 6 e 7: perfil genotípico C; Canaleta 9: perfil genotípico 16M; M: marcador de peso molecular 25bp Step Ladder (Promega, EUA).

Tabela 4 – Número de repetições encontrado em cada locus do MLVA 16 para as amostras de *B. abortus* isoladas do foco de brucelose.

Amostra	Locus															Genótipo
	04	06	07	08	09	11	12	16	18	19	21	30	42	43	45	
1198	3	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
1365	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
1379	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
1414	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2251	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2476	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2496	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2545	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2558	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
2575	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2588	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2595	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2598	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2608	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
2634	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2683	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2700	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2757	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
2774	3	4	4	5	3	4	12	5	6	21	8	6	2	2	3	B
2785	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2922	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
2965	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2980	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
2985	5	3	4	5	3	3	12	3	7	21	8	3	2	2	3	A
3136	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
3144	5	4	7	5	5	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
3159	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C
3169	3	4	7	5	3	4	12	3	6	21	8	5	2	3	3	C

6.DISSCUSSÃO

Na esfera epidemiológica, a caracterização molecular pode e, com frequência, é utilizada para acompanhar a expansão da enfermidade, relacionar surtos de infecções diversas, monitorar medidas profiláticas empregadas em programas de controle e erradicação e acompanhar a microevolução do agente (Van Belkum, 2003). A proposta desse estudo foi avaliar a diversidade genotípica de isolados de *B. abortus* oriundos de um único foco da enfermidade, obtidos em momentos distintos a partir de diferentes espécimes clínicos. E assim, investigar a estabilidade dos marcadores utilizados no *MLVA 16* e sua potencial utilização no PNCEBT, uma vez que o sucesso de programas de controle e erradicação de enfermidades está intimamente associado a uma vigilância epidemiológica ativa e permanente.

Em animais infectados, microrganismos do gênero *Brucella* podem ser frequentemente recuperados a partir de suabes vaginais em um período de até 6 meses seguido do parto ou aborto (Alton et al., 1988). O isolamento é considerado o exame definitivo para o diagnóstico da brucelose, apesar de sua utilização ser pouco eficiente em decorrência do restrito número de bactérias presente nos tecidos, o que dificulta a obtenção de espécimes clínicos não contaminados (Alton et al., 1988). A baixa frequência de isolados de *B. abortus* obtidos a partir de ambos os materiais clínicos utilizados neste estudo (13,04% em suabes vaginais e 7,00% em leite) pode ser explicada em função desta pequena quantidade de microrganismos, somado à grande exigência nutricional e crescimento fastidioso do patógeno, que torna o isolamento menos sensível (Refai, 2003). O pequeno número de isolados pode, ainda, ser consequência das medidas de controle da doença que foram empregadas na propriedade, como diagnóstico de todo o rebanho, eliminação dos animais positivos e vacinação dos animais adultos com amostra RB51.

A demonstração de bactérias viáveis em leite de animais infectados corrobora com os

riscos em saúde pública associados à brucelose bovina, uma vez que o consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados é uma das principais fontes de contaminação para o homem (Pappas et al., 2006). A colonização da glândula mamária e dos linfonodos associados pela *B. abortus* com excreção de microrganismos no leite foi igualmente demonstrada por Xavier et al. (2009). De modo contrário ao observado para amostras de *B. abortus* selvagens, Miranda (2009) demonstrou que a primo-vacinação ou revacinação de animais com cepa RB51 no pós-parto não resulta em excreção desta amostra no leite. Além disso, como ocorrido no presente trabalho Samartino et al. (1999) também não observaram eliminação de RB51 no leite de novilhas vacinadas entre o primeiro e o sétimo mês de gestação.

Entretanto, a partir de suabes vaginais coletados no período seguinte ao parto ou aborto, foi possível recuperar a amostra RB51, fato que oferece risco de infecção humana, sobretudo, risco ocupacional pelo contato direto com os animais. Porém, é importante ressaltar que todos os nove animais dos quais se isolou RB51 neste trabalho foram revacinados com a mesma amostra em idade gestacional superior a 5 meses. Ou seja, em desacordo com as recomendações do MAPA, que recomenda a imunização de fêmeas com idade superior a oito meses que não tenham sido vacinadas com a amostra B19 e de fêmeas adultas, não reagentes aos testes diagnósticos, em estabelecimentos de criação com focos de brucelose (Brasil, 2007). Estes resultados podem ser justificados possivelmente devido a observação de que durante a gestação há uma depressão na resposta mediada por células que contribui para diminuir a resistência a doença ou aumentar a virulência residual das vacinas (Weinberg, 1984). A vacina RB51 é patogênica para o homem com o agravante de ser resistente a rifampicina, antibiótico de escolha para tratamento da brucelose humana (Pappas et al., 2006).

O genótipo A foi observado em todos os dezoito isolados identificados como *B.*

abortus biovariedade 3 (Tabelas 3 e 4), não sendo idêntico a nenhum genótipo depositado no *MLVAbank*, e comparados aos genótipos descritos por Minharro (2009) é distante em um e dois *loci* de dois genótipos encontrados em amostras de *B. abortus* biovariedade 3, isoladas de bovinos do estado de Minas Gerais. As diferenças em relação aos genótipos encontrados por Minharro (2009) estão relacionadas à deleção de duas ou quatro unidades de repetição no *locus* Bruce04 e à deleção de uma unidade no *locus* Bruce19.

O perfil genotípico B foi o menos frequente, encontrado apenas em um isolado classificado à biotipificação como *B. abortus* biovariedade 1 (Tabelas 3 e 4). Para este perfil também não foi observada identidade completa com nenhum genótipo depositado no *MLVAbank*. Entretanto, comparados ao banco de genótipos descrito por Minharro (2009) trata-se de um perfil distante em apenas três *loci* de genótipos relatados para amostras de *B. abortus* biovariedade 1 oriundas de Minas Gerais, as distâncias entre os perfis genotípicos são restritas aos *loci* hipervariáveis Bruce16, Bruce19 e Bruce30.

O terceiro e último genótipo, observado em nove isolados (Tabelas 3 e 4), possui 100% de similaridade com o perfil genotípico da amostra RB51 depositado no *MLVAbank* por LeFlèche et al. (2006) e, também observado por Miranda (2009) e Faria (2010).

A avaliação do *MLVA16* dos isolados obtidos entre julho de 2009 e janeiro de 2010 revela a existência de dois perfis claramente distinguíveis no rebanho, sendo um observado na amostra selvagem presente no foco (A) e o outro na amostra vacinal RB51(C) recuperada de suabes vaginais. Até este momento a estabilidade dos marcadores do *MLVA16* frente à pressão de seleção que ocorre nas infecções naturais é evidente, já que, nenhuma variação nos painéis 1, 2A ou 2B dentro dos respectivos genótipos foi verificada. Entretanto, de maneira subsequente, em fevereiro de 2010, um único isolado foi observado com um novo

perfil genotípico denominado B. As diferenças entre este genótipo e os dois previamente encontrados são grandes e, decorrente não apenas de diferenças nos *loci* hipervariáveis, mas também nos *loci* mais conservados, como o Bruce06, Bruce11 e Bruce 43. Não obstante, discordâncias quanto à classificação em biovariedade também foram observadas. Vistos estes resultados estabelecer uma associação epidemiológica entre os genótipos B e A ou B e C é extremamente difícil.

A investigação epidemiológica do rebanho evidencia que o perfil genotípico B pode ser resultado da introdução de uma nova amostra de *B. abortus* na propriedade. A aquisição de animais infectados é amplamente associada à introdução e brucelose em rebanhos livres (Nicoletti, 1980; Alves et al., 2009; Dias et al., 2009). Neste aspecto, o exame dos dados zootécnicos da propriedade revelou que a amostra de genótipo B foi isolada de um animal originário de compra no período exatamente anterior a este, em novembro de 2009. Adicionalmente, nesse mesmo período é possível observar um repentino aumento na prevalência do rebanho (Figura 1), o que possivelmente ocorreu com a reintrodução da doença, que até o momento tinha uma curva de prevalência com tendência descendente. Assim, a análise conjunta dos dados epidemiológicos e moleculares suporta a idéia de que o genótipo B não está relacionado aos demais genótipos encontrados no foco e que se trata da introdução de outra amostra selvagem na unidade produtiva.

Ao que apontam ainda os dados epidemiológicos a amostra de perfil genotípico A e biovariedade 3 foi primeiro introduzida na propriedade, sem que se possa precisar a maneira ou momento exatos, enquanto que a amostra de perfil B e biovariedade 1 provavelmente entrou no rebanho em meados de novembro de 2009 por meio da compra de novos animais. Dessa forma, as análises de biotipificação e genotipificação sugerem a ocorrência de duas amostras selvagens no foco de brucelose estudado. Considerando-se ainda

estes resultados é possível inferir que há uma baixa diversidade genética entre os isolados dentro de cada genótipo e uma estabilidade *in vivo* dos marcadores que compõem o *MLVA16*.

A estabilidade da amostra vacinal RB51 foi anteriormente avaliada por Faria (2010) em dez passagens seriadas *in vitro* de amostras de diferentes laboratórios também utilizando o *MLVA16*. E de maneira semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, no qual o hospedeiro e ambiente não conduziram alterações no perfil genotípico, também os sucessivos repiques não resultaram em modificações genéticas na amostra vacinal. A microevolução *in vivo* da maioria dos agentes patogênicos é mal compreendida (Struelens, 1998). A frequência dos eventos de mutação pode ser deduzida pelo resultado da tipificação de múltiplos isolados originados da mesma amostra ou de inúmeras passagens desta mesma amostra (Al Dahouk et al., 2007). Whatmore et al. (2006) também observaram que a passagem experimental *in vivo* da amostra de *B. suis* 1330 não induziu mutações significativas detectáveis pela análise de múltiplos *loci* com *VNTR*. Ainda, García-Yoldi et al. (2007b) encontraram uma grande homogeneidade genética entre isolados da amostra vacinal de *B. melitensis* Rev1 obtidas de diferentes períodos e hospedeiros frente ao *MLVA 15*.

Assim, os resultados aqui observados para infecção natural e recuperação da amostra vacinal RB51, e os dados encontrados na literatura indicam que as amostras vacinais e selvagens de *Brucella* spp., tanto quando avaliadas em ensaios *in vivo* quanto *in vitro*, são relativamente estáveis à análise de múltiplos *loci* com *VNTR*. Ou seja, como resultado indireto da análise genotípica de isolados provenientes de mesma origem, pode-se dizer que os marcadores utilizados no *MLVA 16* são estáveis à pressão de seleção que ocorre *in vivo*, sobretudo, nas infecções naturais.

Além disso, a avaliação das variações observadas entre o perfil genotípico A e B e genótipos previamente descritos por Minharro (2009) revela que estas estão

restritas aos *loci* hipervariáveis dos painéis 2A e 2B. Uma vez que, pequenas diferenças entre isolados de mesma origem podem ser explicadas pela microevolução com mutação pontual de um *locus* (Al Dahouk et al., 2007), uma possível relação epidemiológica entre as amostras previamente observadas em Minas Gerais e o conjunto de isolados aqui associados à infecção natural pode ser inferida.

Um bom método de tipificação precisa permitir a diferenciação clara de isolados não relacionados e ao mesmo tempo ser capaz de demonstrar as relações entre todos os organismos isolados de indivíduos infectados pela mesma fonte (Whatmore et al., 2006). Neste sentido a estabilidade dos marcadores genéticos usados na tipificação molecular deve ser tal que, ao mesmo tempo permita a técnica um alto poder discriminatório e a associado a capacidade de relacionar isolados de mesma origem. O *MLVA 16*, método sugerido para tipificação molecular do gênero *Brucella*, é uma técnica com alto poder discriminatório principalmente em decorrência dos octâmeros que compõe os painéis 2A e 2B (Al Dahouk et al., 2007). E os resultados aqui observados para infecção natural e recuperação da amostra vacinal RB51 indicam que se trata também de uma técnica com marcadores estáveis. Ou seja, como resultado indireto da análise genotípica de isolados provenientes de mesma origem, pode-se dizer que os marcadores utilizados no *MLVA 16* são estáveis à pressão de seleção que ocorre *in vivo*, sobretudo, nas infecções naturais e dessa forma, tem um potencial maior em contribuir para o entendimento da cadeia de transmissão da brucelose no país.

7. CONCLUSÕES

A tipificação molecular, pelo *MLVA16*, dos isolados de *B. abortus*, amostras selvagens e RB51, oriundos de um único foco de brucelose bovina, permite concluir que existe uma baixa diversidade genética entre os isolados, mesmo quando avaliados durante um período de 13 meses e a partir de materiais clínicos distintos; e que, conseqüentemente, os marcadores que

compõem o MLVA 16 são estáveis quando submetidos à pressão seletiva nas infecções naturais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES, Pecuária Brasileira 2010. Disponível em :<
http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp#>.
Acessado em: 03.11.2010.

ACHA, P.; SZYFRES, B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. 536p.

AL DAHOUK, S.; LE FLÈCHE, P.; NÖCKLER, K.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; SCHOLZ, H.C.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Meth.*, v. 69, n. 1, p. 137-145, 2007.

ALTON, G.G. ; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de La Recherche Agronomique, 1988. 188p.

AMIN, A. S., HAMDY, M.E.R., IBRAHIM, A.K. Detection fo *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.*, v.83, n.1, p.37-44, 2001.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; Stoker, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 95, p. 271-275, 1992.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numeric Index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpsons's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 8 de janeiro de 2004 aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 6 – 10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 33, de 24 de agosto de 2007. Estabelece condições para vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51. *Diário Oficial da União*, Brasília, 28 ago. 2007. Seção 1, p. 6.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº - 27, de 20 de outubro de 2010. Aprovado Teste de Polarização Fluorescente para o Diagnóstico da Brucelose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 out. 2010. Seção 1, p. 1.

BRICKER, B.J., EWALT, D.R., Evaluation of the HOOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol.*, v.5, n.37, 2005.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p. 435-446, 2002.

BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol*, v. 3, n. 15, 2003.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.

- BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, n. 6, p. 1640-1642, 1995.
- CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl. 1, p.46-55, 2009.
- CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. (Ed.). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: World Health Organization Press, 2006. 89p.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n. 2, p.213-221, 1997.
- CRAWFORD, R.P.; HUBBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 131-151.
- DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R.J.; PATRA, G.; MUJER, C.; LOS, T.; IVANOVA, N.; ANDERSON, I.; BHATTACHARYYA, A.; LYKIDIS, A.; REZNIK, G.; JABLONSKI, L.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; SELKOV, E.; ELZER, P.H.; HAGIUS, S.; O'CALLAGHAN, D.; LETESSON, J.J.; HASELKORN, R.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 99, n. 1, p. 443-448, 2002.
- DIAS, J.A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, M.C.P.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl.1, p. 66-76, 2009.
- FARIA, A.P. Estudo de variabilidade genética de linhagens vacinais B19 e RB51 de *Brucella abortus* via análise em *Multilocus* de repetições em *Tandem* de número variável – MLVA. 2010. 40f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.4, n. 1, p.79-83, 1992.
- FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S. M.; SANBORN, M. R. Preliminary development of a diagnostic test for a *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 69, n. 8, p.216-227, 1990.
- FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNIG, S.D.; MARRS, C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.*, v. 2, n.10, 2005.
- FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol.*, v. 144, n. 7, p. 1189-1196, 1998.
- GARCÍA-YOLDI, D.; LE FLECHE, P.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; CVETNIC, Z.; MARÍN, C.M.; VERGNAUD, G.; LÓPEZ-GOÑI, I. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Other PCR-Based Methods for Typing *Brucella suis* Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 12, p. 4070-4072, 2007a.
- GARCÍA-YOLDI, D.; LE FLÈCHE, P.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; VERGNAUD, G.; LÓPEZ-GOÑI, I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *Vaccine*, v. 25, n. 12, p. 2858-2862, 2007b.

- GRISSA, I.; BOUCHON, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*, v. 90, n. 4, p. 660–668, 2007.
- GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v.36, n. 3, p.313-326, 2005.
- GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO, T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, supl. 1, p. 35-45, 2009.
- HALLING, S.M.; PETERSON-BURCH, B.D.; BRICKER, B.J.; ZUERNER, R.L.; QING, Z.; LI, L.L.; KAPUR, V.; ALT, D.P.; OLSEN, S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.187, n. 8, p. 2715–2726, 2005.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário 2008; Minas Gerais. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em: 11.11.2010.
- KATTAR, M.M.; JAAFAR, R.F.; ARAJ, G.F.; LE FLÈCHE, P.; MATAR, G. M.; RACHED, R.A.; KHALIFE, S.; VERGNAUD, G. Evaluation of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Scheme for Typing Human *Brucella* Isolates in a Region of Brucellosis Endemicity. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 12, p. 3935-3940, 2008.
- KEIM P, PRICE LB, KLEVYTSKA AM, SMITH KL, SCHUPP JM, OKINAKA R, JACKSON PJ, HUGH- JONESME. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, v. 182, n. 10, p. 2928–2936, 2000.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, n. 1, p.65-78. 2003.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Controle da Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.30-41, 2005.
- LE FLECHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUDE, F.; RAMISSE, V.; SYLVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.*, v. 1, n. 2, 2001.
- LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; GUILLOTEAU, L.A.; VERGNAUD, G. Evolution and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, v. 6, n. 9, 2006.
- LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I.O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. *J. Clin. Microbiol.* v.33, n.12, p.3087-3090, 1995.
- LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.E.. Bacterial strain typing in genomic era. *Fems. Microbiol. Rev.*, v. 33, n. 5, p. 892–916, 2009.

- LINDSTEDT, B.A.; HEIR, E; GJERNES, E; KAPPERUD, G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 4, p. 1469–1471, 2003.
- LINDSTEDT, B.A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, v. 26, n. 13, p. 2567–2582, 2005.
- LÓPEZ-GOÑI, I; GARCÍA-YOLDI, D; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M.I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-Ladder) for Molecular Typing all *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 10, p. 3484-3487, 2008.
- LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.*, v.174, n. 14, p. 4525–4529, 1992.
- MAQUART, M.; LE FLÈCHE, P.; FOSTER, G.; TRYLAND, M.; RAMISSE, F.; DJØNNE, B.; AL DAHOUK, S.; JACQUES, I.; NEUBAUER, H.; WALRAVENS, K.; GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; VERGNAUD, G. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.*, v. 9, n. 145, 2009.
- MARIANELLI, C.; GRAZIANI, C.; SANTANGELO, C.; XIBILIA, M.T.; IMBRIANI, A.; AMATO, R.; NERI, D.; CUCCIA, M.; RINNONE, S.; DI MARCO, V.; CIUCHINI, F. Molecular Epidemiological and Antibiotic Susceptibility Characterization of *Brucella* Isolates from Humans in Sicily, Italy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 9, p. 2923-2928, 2007.
- MARIANELLI, C.; PETRUCCA, A.; PASQUALI, P.; CIUCHINIA, F.; PAPADOPOULOU, S.; CIPRIANI, P. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. *J. Hosp. Infect.*, v. 68, n. 3, p. 274-276, 2008.
- MATAR, G.M.; KHNEISSER, I.A.; ABDELNOOR, A.M. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-kiloDalton *Brucella* Antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, n 2, p.477-478, 1996.
- MINHARRO, S. Isolamento, Tipificação e Genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil. 2009. 77p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MIRANDA, K. L.; ALVES, C.M.; MINHARRO, S.; LÔBO, J.R.; MULLER, E.E.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT. *Leite Integral*, Belo Horizonte, out-nov, p. 44-55, 2008.
- MIRANDA, K. L. Evaluation of Brucellosis Vaccines in Brazil. 2009.121p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1-4, p. 209–227, 2002.
- NEGREIROS, R.A., DIAS, F., FERREIRA NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.G.; SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, supl.1, p.56-65, 2009.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.24, p. 69-98, 1980.

- NICOLETTI, P. Effects of brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in theriogenology* 2 ed., Philadelphia : W.B. Saunders, 1986. p.271-274.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* , v. 90, n.1-4, p.447-459, 2002.
- NIELSEN, K.; LIN, M.; GALL, D.; JOLLEY, M. Fluorescent polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*, v. 22, p. 71-76, 2000.
- O.I.E. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2008. Disponível em : <www.oie.int>. Acessado em: 29 de dezembro de 2010.
- OCAMPO-SOSA, A.A.; AGUERO-BALBIN, J.; GARCIA-LOBO, J.M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, v. 110, n. 1-2, p. 41-51, 2005.
- OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert. Rev. Vaccines*, v. 4, p. 915-928, 2005.
- PAPPAS, G., PANAGOPOULOU, P., CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 63, n. 19-20, p. 2229–2236, 2006.
- PAULSEN, I.T.; SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A.; HEIDELBERG, J.F.; READ, T.D.; DODSON, R.J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.M.; BEANAN, M.J.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; NELSON, W.C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S.R.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; HOOVER, D.L.; LINDLER, L.E.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M.; FRASER, C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 99, n. 1, p. 13148–13153, 2002.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let. Appl. Microbiol.*, v.8, p. 151–156, 1989.
- POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.13-29, 2005.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, n. 1-4, p.55-62, 2002.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L.; OLSEN, S.O.; SCHURIG, G.G.; LAGE, AP. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*. v.24, n. 25, p. 5327-5334, 2006.

- POURCEL, C.; VIDGOP, Y.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G.; TRAM, C. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 5, p. 1819–1826, 2003.
- QUEIPO-OTURNO, M. I.; MORATA, P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; COLMENERO, J.D. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *J.Clin. Microbiol.*, v.35, n.11, p. 2927-2930, 1997.
- RAY, W.C. Brucellosis due to *Brucella abortus* e *Brucella suis*. In: STEELE, J.H. (Ed). *CRC Handbook Series in Zoonosis*. Boca Raton: CRC Press, 1979, p. 99-127.
- REFAI, M. Application of biotechnology in diagnosis and control of brucellosis in the Near East Region. *World J. Microb. & Biotec.*, v 19, n. 5, p. 443-449, 2003.
- RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet. Microbiol.*, v.87, n. 2, p.139-147, 2002.
- ROCHA, W.V.; GONCALVES, V.S.P.; COELHO, C.G.N.F.L.; BRITO, W.M.E.D.; DIAS, R.A.; DELPHINO, M.K.V.C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BRITO, L.A.B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, supl.1, p.27-34, 2009.
- ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M. et al. Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J of Clin. Microbiol.*, v.33, n.3, p. 615-617, 1995.
- SAMARTINO, L.E.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R. Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* em hembras bovinas preñadas. *Vet. Arg.*, v.16, p.107-112, 1999
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2100p.
- SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 60 p. 801-808, 2010.
- SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the commom vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 58, p. 375-382, 2008.
- SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.28, n. 2, p. 171-188, 1991.
- SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.;CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n.1-4, p. 479-496, 2002.
- SIKUSAWA, S., AMAKU, M., DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, supl.1, p.103-108, 2009.
- SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Brucelose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p. 1-12, 2005.

- SMITS, H. L.; ESPINOSA, B.; CASTILLO, R.; HALL, E.; GUILLEN, A.; ZEVALETA, M.; GILMAN, R.H.; MELENDEZ, P.; GUERRA, C.; DRAEGER, A.; BROGLIA, A.; NÖCKLER, K. MLVA genotyping of human *Brucella* isolates from Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103, n. 4, p. 399-402, 2009.
- STEVENS, M.G., OLSEN, S.C., CHEVILLE, N. F. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 Proteins in RB51-vaccinated ou 2308-infected Cattle. *Infect Immun.*, v.64, n. 3, p.1007-1010, 1994a.
- STEVENS, M.G., OLSEN, S.C., CHEVILLE, N.F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.44, n. 3-4, p.223-235, 1995.
- STEVENS, M.G., OLSEN, S.C., PUGH JR, G.W. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* 2308 ou RB51 antigens in mice infected with strain 2308, RB51 or 19. *Infect. Immun.*, v.62, n.11, p.4659-4663, 1994b.
- STEVENS, M.G., OLSEN, S.C., CHEVILLE, N.F. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle. *Infect. Immun.*, v.64, n. 3, p.1007-1010, 1996.
- STRUELENS, M. Molecular typing: a key tool for the surveillance and control of nosocomial infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 15, n. 4, p. 383-385, 2002.
- STRUELENS, M. Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 5, p. 581-585, 1998.
- TIBAYRENC, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasit. Today*. v. 14, n. 8, p. 323-329, 1998.
- VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN LEEUWEN, W.; WILLEMSE, D.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenza*. *Infect. Immun.*, v. 65, n. 12, p. 5017-5027, 1997.
- VAN BELKUM, A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 9, n. 2, p. 86–100, 2003.
- VAN BELKUM, A.; STRUELENS, M.; DE VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 14, n. 3, p. 547-560, 2001.
- VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; GRAYON, M. *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 35, n. 3, p. 292-295, 1985
- VERGNAUD, G.; DENOEUDE, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res*, v. 10, n. 7, p. 899-907, 2000.
- VERGNAUD, G.; POURCEL, C. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis. In: STACKEABRANDT, E.(Ed.). *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2006, p. 83-104.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKIL, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, v. 19, n. 24, p. 6823 -6831, 1991.
- WEINBERG, E.D. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev. Infect. Dis.*, v. 6, n. 6, p. 814-831, 1984

WHATMORE, A.M.; SHANKSTER, S.J.; PERRETT, L.L. MURPHY, T.J.; BREW, S.D.; THIRLWALL, R.E.; CUTLER, S.J.; MACMILLAN, A.P. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 6, p. 1982-1993, 2006.

WHATMORE, M.A.; PERRETT, L.L.; MACMILLAN, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.*, v. 7, n. 34, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The development of new/improved brucellosis vaccines: Report of a WHO Meetin 11-12 december, 1997. Geneva, Switzerland.

WYCKOFF III, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.*, v.90, n. 1-4, p.395-415, 2002.

XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, 2009.

Anexo 1 – Protocolo 139/10 - Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 139/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da eficácia e imunidade da vacina RB51 e circulação de amostras de Brucella abortus em rebanho com foco de Brucelose**", que tem como responsável(is) **Andrey Pereira Lage**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 06/2010**.

Este certificado expira-se em **23/ 06/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 139/2010**, related to the project entitled "**Assessment of efficacy and immunity of RB51 vaccine and circulation of Brucella abortus strains in herd with and outbreak of brucellosis**", under the supervisors of **Andrey Pereira Lage**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 23, 2010**.

This certificate expires in **June 23, 2015**.

Belo Horizonte, 24 de Junho de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)