

Mayra da Silva Oliveira

**Epidemiologia Molecular de Isolados de *Brucella abortus* de bovinos no Brasil,
2009 a 2013**

Dissertação apresentada a 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: Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2017

O48e

Oliveira, Mayra da Silva, 1990-

Epidemiologia molecular de isolados de *Brucella abortus* de bovinos no Brasil, 2009 a 2013 / Mayra da Silva Oliveira. – 2017.

63 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Co-orientadora: Elaine Maria Seles Dorneles

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

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

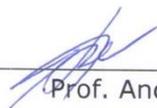
CDD – 636.089 695 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYRA DA SILVA OLIVEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

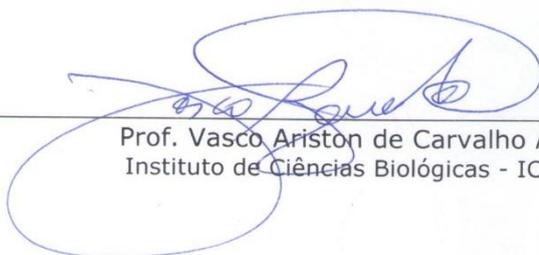
Aprovada em 22 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



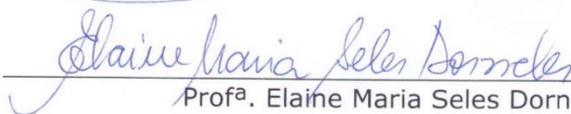
Prof. Andrey Pereira Lage
Presidente - Orientador



Dr.ª. Fernanda Alves Dorella
Laboratório Oficial Central - AQUACEN



Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Instituto de Ciências Biológicas - ICB



Prof.ª. Elaine Maria Seles Dorneles
Universidade Federal de Lavras - UFLA

À

Minha amada família: Mãe e Pai, Tia e Tio, Iara, Tancredo, Maria Clara, Vitor Mikael e Helton pelo amor e incentivo, dedico esta conquista.

“É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.”
Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e fortaleza.

A minha mãe, Iracema, e meu pai, Mário, pelo amor incondicional. Obrigada por acreditarem em mim!

A minha irmã, Iara, pelo amor maternal e apoio singular. Você é uma parte de mim!

Ao meu irmão, Tancredo, e meus sobrinhos amados, Maria Clara, Vitor Mikael e Arthur, pelo amor e carinho.

Aos meus tios, Maria Ney e Paulo Roberto, pela oportunidade, criação, serenidade e confiança. Sem ajuda de vocês teria sido praticamente impossível sair de uma pequena cidade do interior e chegar até aqui!

A minha avó, Eva, um exemplo de força em minha família.

Ao meu namorado, Helton, pelo amor, Ocompanheirismo e paciência. Obrigada meu herói!

Ao Prof. Andrey pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Obrigada por me aceitar para realizar o estágio curricular e na orientação do mestrado.

A Elaine pela confiança, amizade, ensinamentos, compreensão e incentivo. Nunca esquecerei tudo que fizeste por mim!

Ao Ermilton pela amizade leal e companheira. Obrigada por sempre “estar” quando eu mais precisei! Você é sem dúvida um “amigo de verdade”.

Aos colegas do LBA por todo o carinho e incentivo, em especial, ao Dionei, Jamili, Ethiene, Andréa, Telma, Jonata, Carol, Gabi, Fernanda, Luciana. Foi um grande prazer ter conhecido e convivido com vocês!

Aos amigos Arannadia, Renata, Givanildo, Telissa e Conrado pela amizade e apoio.

A Nathália, uma grande amiga da pensão da Dona Deth.

As minhas amigas de ap, Kenya e Layanne.

A todos os técnicos e funcionários do DMVP que colaboram para realização desse trabalho e aprendizado nesta escola. Especialmente a Grazielle, Graciela, Agda, Eduardo, Gustavo e Renata.

A todos os funcionários do Colegiado de Pós-Graduação. Em especial a Luzete e Luís.

Ao CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro ao projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	08
	ABSTRACT.....	08
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	Brucelose bovina	14
3.2	Diagnóstico de <i>Brucella</i> spp.	16
3.3	Epidemiologia Molecular e Análise Múltiplos <i>loci</i> de VNTR (MLVA)	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Amostras de <i>Brucella abortus</i>	24
4.2	Obtenção do DNA genômico	24
4.3	PCR gênero-específica	24
4.4	PCR espécie-específica	25
4.5	Análise de múltiplos <i>loci</i> de VNTR (MLVA)	26
4.6	Índice de diversidade	28
4.7	Análise dos genótipos	28
5	RESULTADOS.....	30
5.1	PCR Gênero-Específica e PCR Espécie-Específica	30
5.2	MLVA e HOOF-print	30
5.2.1	MLVA8	30
5.2.2	MLVA16	33
5.2.3	MLVA16 associado aos HOOF-print 3 (Bruce25) e HOOF-print 4 (Bruce20)	39
6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8	ANEXOS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores utilizados nos painéis 1, 2A e 2B do <i>MLVA16</i> , e painel 3(<i>Hoof-print 3 e 4</i>)	27
Tabela 2 -	Genótipos e o número de representantes por perfil genotípico descritos no <i>MLVA8</i>	31
Tabela 3	Diferenças entre os perfis genotípicos de <i>B. abortus</i> isolados de 2009 a 2013 e isolados de 1977 a 2008	33
Tabela 4 -	Genótipos mais frequentes encontrados pelo <i>MLVA16</i> , número de representantes por genótipo, frequência, origem da amostra, <i>locus/loci</i> de deleção ou adição e origem do genótipo com proximidade	38
Tabela 5 -	Índice de diversidade (HGDI) calculado para cada <i>locus</i> do <i>MLVA16</i> , <i>MLVA8</i> , <i>MLVA16</i> , <i>MLVA16</i> associado ao <i>HOOF-print3</i> (Bruce25), <i>MLVA16</i> associado ao <i>HOOF-print4</i> (Bruce20) e <i>MLVA16</i> associado aos <i>HOOF-print3</i> e 4 (Bruce25 e Bruce20)	40
Tabela 6	Dados gerais: identificação da amostra, unidade de repetição em cada <i>locus</i> , genótipo pelo <i>MLVA16</i> , genótipo pelo <i>MLVA8</i> , estado de origem, ano de isolamento	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição, por Estado, de amostras de <i>B. abortus</i> isoladas no Brasil pelo LANAGRO de 2009 a 2013.	24
Figura 2 -	Gel de agarose a 1% mostrando amplificação, pela PCR gênero-específica para <i>Brucella</i> sp. corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Canaleta M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs); canaleta CN: controle negativo, canaleta CP: controle positivo (amostra de referência 544), canaletas 1, 2, 3, 4, 5: amostras isoladas confirmadas como pertencentes ao gênero <i>Brucella</i> .	30
Figura 3 -	<i>Minimum Spanning Tree</i> (MST) de isolados bovinos de <i>B. abortus</i> usando os dados de <i>MVLA8</i> e <i>MLVA16</i> . A MST é apresentada com a maior pontuação geral de confiabilidade e foi calculada utilizando UPGMA associado com a regra de prioridade e a reamostragem por bootstrap para amostras de <i>B. abortus</i> isoladas de bovinos no Brasil de 2009 a 2013. A) Os números em cada complexo clonal representam os genótipos pelo <i>MLVA8</i> . B) Os números em cada complexo clonal representam os genótipos pelo <i>MLVA8</i> , utilizando os dados do <i>MLVA16</i> . As informações sobre a origem dos isolados estão discriminadas por cores.	32
Figura 4 -	Dendograma obtido a partir da análise dos genótipos das 140 amostras isoladas de <i>B. abortus</i> pelo <i>MLVA16</i> . Estão descritos os genótipos e número de representantes por genótipo	34
Figura 5 -	Distribuição dos genótipos obtidos a partir do <i>MLVA16</i> de amostras de <i>B. abortus</i> isoladas de bovinos no Brasil entre os anos de 2009 a 2013. Em parênteses está descrito o número de representantes de cada genótipo por estado	35
Figura 6 -	Dendograma obtido a partir da análise dos genótipos das 140 amostras isoladas de <i>B. abortus</i> pelos 16 <i>loci</i> de <i>VNTR</i> do <i>MLVA16</i> acrescidos <i>HOOF-print 3</i> e 4(Bruce25 e Bruce20). Nas colunas, da esquerda para direita, estão descritas: cidade, identificação da amostra, ano de isolamento e estado.	41

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram tipificar a diversidade genotípica de amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil entre 2009 e 2013, e analisar sua distribuição como apoio ao programa brasileiro de controle e erradicação da brucelose. Cento e quarenta amostras isoladas de bovinos no Brasil entre 2008 e 2013 foram genotipadas usando um conjunto de 18 VNTR (*MLVA16* + Hoof-Print 3 + Hoof-Print 4). A análise dos *MLVA8* revelaram oito genótipos diferentes entre as amostras de *B. abortus*, incluindo cinco descritos anteriormente e três novos. A Análise dos loci *MLVA16* revelou cinquenta e oito genótipos distintos, dos quais três eram idênticos, trinta e oito foram consideradas próximos, e dezessete foram consideradas distantes em comparação com aqueles descritos anteriormente e depositados em *MLVAbank*. A análise do Hoof-print 3 e 4 revelou o maior número de alelos diferentes entre todos VNTR avaliados, exibindo a resolução máxima quando associada aos marcadores do *MLVA16*. Os resultados deste trabalho validam a utilidade da técnica *MLVA*, especialmente *MLVA16*, na epidemiologia molecular de *B. abortus*. Este estudo também fornece um reflexo sobre os genótipos de *B. abortus* em circulação no Brasil, o que certamente contribuem para a melhor compreensão da epidemiologia e controle da brucelose bovina no país. Além disso, os dados deste estudo mostraram uma alta diversidade genética entre os isolados de *B. abortus* e uma estreita entre as amostras brasileiras de *B. abortus* depositados por *MLVAbank*, demonstrado pela divergência micro-evolutiva resultante de mutações em locais hipervariáveis.

Palavras-chave: *MLVA*, VNTR, HOOF-print, genótipos, brucelose, bovinos.

ABSTRACT

The aims of the present study were genotype *Brucella abortus* strains isolated from cattle in Brazil between 2009 and 2013, and to analyze their distribution to support the Brazilian program on control and eradication of brucellosis. One hundred and forty strains isolated from cattle in Brazil between 2008 and 2013 were genotyped using a set of 18 VNTR (*MLVA16* + HOOF-Print 3 + HOOF-Print 4). The analysis of *MLVA8* revealed eight different genotypes among *B. abortus*

strains, including five previously described and three new ones. Analysis of the *MLVA16 loci* revealed fifty-eight distinct genotypes, from which three were identical, thirty-eight were considered very close, and seventeen were considered distant compared to those previously described and deposited in MLVAbank. Analysis of the HOOF-Prints 3 and 4 revealed the larger number of different alleles among all VNTR assessed, exhibiting maximum resolution when associated with *MLVA16* markers. Our results validate the usefulness of the MLVA technique, especially *MLVA16*, in the molecular epidemiology of *B. abortus*. This study also provides insights on the genotypes of *B. abortus* circulating in Brazil, which certainly contribute for the better understanding of the epidemiology and control of bovine brucellosis in the country. Moreover, our data showed a high genetic diversity among the *B. abortus* isolates and a close relationship among these strains and Brazilian *B. abortus* deposited by MLVAbank, demonstrated by micro-evolutionary divergence arising from mutations in hypervariable *loci*.

Keywords: MLVA; VNTR; HOOF-Print; genotyping; brucellosis; cattle.

1. INTRODUÇÃO

Um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro é a pecuária bovina. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, é considerado o maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina, além de sexto maior produtor de leite (BRASIL, 2014a). A pecuária de corte é um dos pilares do agronegócio brasileiro e a cadeia produtiva da carne movimenta R\$ 167,5 bilhões por ano, gerando aproximadamente 7 milhões de empregos (BRASIL, 2014b). Por outro lado a pecuária leiteira movimenta aproximadamente R\$ 27,6 bilhões de reais anualmente, contribuindo principalmente para a economia das pequenas e médias cidades brasileiras (BRASIL, 2014a). Porém, por questões sanitárias e de qualidade, o mercado da carne bovina brasileira não consegue acessar mercados mais nobres. Ainda que o Programa de Erradicação da Febre Aftosa esteja em fase avançada no país, outras enfermidades como brucelose e tuberculose representam ameaças com implantação de sanções ao comércio da carne (Miranda et al., 2008; Valente et al., 2011).

A brucelose é uma doença zoonótica de importância econômica reconhecida em todo mundo, causada por bactérias do gênero *Brucella* (Foster et al., 2007). São descritas mais de dez espécies dentro do gênero, com seis espécies consideradas clássicas: *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (cães), *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (rato do deserto) (Glynn e Lynn, 2008; Godfroid et al., 2010). Esta classificação baseia-se principalmente nos hospedeiros preferenciais de cada espécie e na patogenicidade das mesmas (Moreno et al., 2002). Outras espécies tais como: *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, foram descritas como patógenas de mamíferos marinhos; *B. microti* foi isolada de rato silvestre e *B. inopinata* foi isolada do implante mamário em uma mulher (Scholz e Vergnaud, 2013). Além destas, novas espécies tem sido investigadas, como *B. papionis* isolada de babuínos e uma nova espécie isolada de rãs (Whatmore et al., 2014; Muchowski et al., 2014).

Por se tratar de uma zoonose, o controle e prevenção da brucelose nos animais é essencial para erradicar a doença em seres humanos (WHO, 1997; Adone e Pasquali, 2013). No Brasil foi implementado em 2001, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Poester et al., 2009). Nos programas de erradicação da brucelose, a identificação das espécies de *Brucella* e seus biovars estão orientados principalmente por testes microbiológicos, sorologia e testes bioquímicos. Durante muitos anos, a caracterização fenotípica foi um dos poucos instrumentos disponíveis para investigação de relações epidemiológicas entre isolados, no entanto por estes métodos o rastreamento da fonte de infecção é limitado, o que dificulta a aplicação de medidas para impedir a propagação da doença (Al Dahouk et al., 2007; Whatmore et al., 2009). Em fases avançadas dos programas, como na fase de erradicação, a vigilância intensiva deve ser mantida

para confirmar que o agente não está presente na população (FAO, 2015). Nos países em que a brucelose foi erradicada ou controlada, os programas de vigilância epidemiológica foram essenciais para evitar o ressurgimento da doença (Bricker et al., 2003).

Para o controle da brucelose, especialmente nos estágios finais de um programa de erradicação, é necessário um rigoroso programa de vigilância e métodos altamente discriminatórios para a caracterização de amostras presentes em surtos. Estas técnicas podem ser utilizadas em estudos de monitoramento para determinar a fonte original da infecção e suas vias de transmissão (Almendra et al., 2009). Os métodos de detecção molecular de *Brucella* spp. por reação em cadeia da polimerase (PCR) e a genotipagem são ferramentas epidemiológicas poderosas para confirmação da doença e para identificação das fontes de infecção. Estes métodos reduzem o risco de infecções laboratoriais por minimizar a manipulação do agente. Além disso, são ensaios realizados em curto espaço de tempo, permitem o diagnóstico mais rápido e acessível, mesmo em áreas remotas (Franco et al., 2007).

Após o sequenciamento de espécies de *Brucella* foi possível a identificação de sequências de DNA variáveis, utilizadas como marcadores epidemiológicos (Bricker et al., 2003). Estes marcadores constituem fragmentos conhecidos como *Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)* que são sequências repetidas em tandem no genoma bacteriano. Estas repetições provaram ser um alvo adequado para a avaliação do polimorfismo genético dentro das espécies bacterianas (Lé Fleche et al., 2006; Whatmore et al., 2006; Her et al., 2009).

As ferramentas moleculares para a genotipificação permitem avaliar a relação genética entre os isolados de campo, estes ensaios são destinados a complementar os testes diagnósticos existentes, PCR e diagnóstico bacteriológico, que são utilizados atualmente para classificação das espécies de *Brucella* e identificação de biovar (Bricker et al., 2003). Estes métodos moleculares são também usados para estudar a diversidade genética entre as várias espécies de *Brucella* em um contexto evolutivo ou em cenários de surto (Scholz e Vergnaud, 2013). Entre as metodologias de tipificação molecular utilizadas para *Brucella* spp. destaca-se a Análise de Múltiplos Loci de VNTR - MLVA (*Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats-VNTR Analysis*) que permite a diferenciação de perfis genotípicos entre os isolados de *Brucella* e as relações entre eles. O conjunto de 16 marcadores de VNTR, *MLVA16*, é uma técnica de tipificação molecular com alta capacidade discriminatória e reprodutibilidade, composto por 16 loci de VNTR, primeiramente descrita por Lé Fleche et al. (2006) (*MLVA 15*) e adaptada por Al Dahouk et al. (2007) (*MLVA16*), proposta para análise genética do gênero *Brucella* (Lé Fleche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). A capacidade de discriminação e de rastreamento do *MLVA* pode ser aumentada quando associado aos loci de VNTR *Hoof-print 3* e *Hoof-print 4* (Her et al., 2009; Whatmore et al., 2015).

O *MLVA16* se apresenta como importante ferramenta em estudos epidemiológicos sobre brucelose no mundo (Al Dahouk et al., 2007; Kattar et al., 2008; De Santis et al., 2011; Jiang et al., 2011; Di et al., 2014; Shevtsov et al., 2015), na caracterização de novas espécies de *Brucella* (Scholz et al., 2008), na avaliação de fontes de infecção humana (Marianelli et al., 2008; Marquat et al., 2009; Jiang et al., 2011) e na avaliação da estabilidade genética de linhagens vacinais (Garcia-Youldi et al., 2007; Her et al., 2009; Dorneles et al., 2013; Miranda et al., 2013). Na genotipificação de 137 amostras de *B. abortus* de diversas regiões do Brasil, isoladas entre 1977 e 2008, utilizando o *MLVA16*, foram encontrados 89 diferentes genótipos. Este estudo contribuiu para o início da construção de um banco de dados de genótipos de *Brucella* spp. do país. Estes dados futuramente contribuirão para uma melhor compreensão da epidemiologia e controle da brucelose bovina no Brasil (Minharro et al., 2013).

Dessa forma, a técnica de genotipificação utilizando marcadores de *VNTR*, *MLVA* e *HOOOF-print*, apresenta grande potencial para contribuir no PNCEBT sobre o entendimento da cadeia de transmissão e vigilância epidemiológica da brucelose bovina, permitindo a rastreabilidade das fontes de infecção e o estudo das relações genéticas dentro da espécie e gênero.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Tipificar as amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil entre 2009 e 2013 utilizando o *MLVA*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a diversidade genética das amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil entre 2009 e 2013 utilizando o *MLVA16*;
- Relacionar a frequência dos genótipos encontrados com os dados epidemiológicos das amostras;
- Comparar os genótipos encontrados no presente estudo aos já depositados no Banco *MLVAbank for Bacterial Genotyping*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Brucelose bovina

A brucelose é uma doença causada por bactérias do gênero *Brucella* spp. e representa uma das principais zoonoses em todo o mundo (Godfroid et al., 2002; Corbel et al., 2006). *Brucella* spp. são bactérias Gram-negativa, intracelulares facultativas que podem infectar muitas espécies de animais (domésticos e silvestres) e os seres humanos (Olsen et al., 2010).

A infecção por *Brucella* spp. pode persistir por longos períodos, tanto em animais quanto em seres humanos (Mick et al., 2014). Como agravante a brucelose também causa impactos consideráveis na saúde pública, já que mais de 500.000 novas infecções são relatadas anualmente em seres humanos (Pappas et al., 2006). Apesar de possuir distribuição geográfica limitada, a brucelose continua a ser um importante problema de saúde pública na região do Mediterrâneo, Ásia ocidental, partes da África e América Latina (Pappas et al., 2006).

Brucella spp. pode ser transmitida ao homem por meio de consumo de produtos contaminados, principalmente leite e derivados lácteos não pasteurizados ou por contato direto com animais infectados (BRASIL, 2006). Nos seres humanos, a doença geralmente causa febre ondulante, mal-estar e mialgia, por vezes associada com complicações graves, como encefalite, meningite, espondilite, artrite supurativa e endocardite vegetativa. A doença também pode ocorrer de forma crônica, afetando assim vários órgãos e tecidos (Franco et al., 2007; Carvalho Neta et al., 2010).

Em bovinos *B. abortus* é a principal espécie causadora de doença (Lage et al., 2008) e sua transmissão está associada principalmente com falhas de manejo, comércio e circulação de animais sem restrições, trânsito livre de animais em feiras e exposições locais, a prática de não segregar o rebanho por faixa etária, e o uso de sêmen de touros infectados ou de estado de saúde desconhecido para inseminação artificial (Gwida et al., 2010).

A via oral é a principal forma de infecção do bovino por *B. abortus*, embora a infecção também possa ocorrer pela via aerógena ou via soluções de continuidade na pele (Acha e Szyfres, 2003). Vale ressaltar que, a enorme quantidade de bactérias eliminadas durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à grande resistência de *B. abortus* no ambiente, é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (Lage et al., 2008). Após infecção, *Brucella* spp. é direcionada aos gânglios linfáticos replicando-se intracelularmente em fagócitos (Carvalho Neta et al., 2010). A invasão de vasos linfáticos é seguida por bacteremia que conduz a infecção sistêmica, favorecendo a colonização do útero gravídico, órgãos genitais masculinos e glândula mamária (Xavier et al., 2010). Os sinais clínicos mais frequente são aborto no terço final da gestação, natimortos e nascimento de bezerros fracos. Frequentemente, ocorre retenção

placentária e infertilidade temporária ou permanente, nos machos, as bactérias podem instalar-se nos testículos, epidídimos e vesículas seminais (Lage et al., 2008). A infecção por *B. abortus* pode causar orquite uni ou bilateral com conseqüente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (BRASIL, 2006; Lage et al., 2008).

Com objetivo de diminuir os impactos econômicos advindos da persistência de brucelose e tuberculose em rebanhos bovinos no Brasil, foi instituído em 2001, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2006). Este programa é orientado pelas condutas recomendadas pelos organismos internacionais e com flexibilidade para permitir a sua implementação nos heterogêneos estados brasileiros (Poester et al., 2009). Para controle e erradicação da brucelose foram definidas medidas sanitárias compulsórias, como vacinação de bezerras e controle de trânsito animal, associadas a ações de adesão voluntária, como certificação de propriedades livres e monitoradas para a doença (BRASIL, 2006).

No Brasil, o único estudo nacional sobre a situação da brucelose bovina antes da implantação do PNCEBT foi realizado em 1975, sendo estimada a porcentagem de animais soropositivos na Região Sul de 4%, na Região Sudeste de 7,5%, na Região Centro-Oeste 6,8%, na Região Nordeste de 2,5% e 4,1% na Região Norte (BRASIL, 2006). Após implantação do PNCEBT, em 2004, já foram concluídos os estudos de caracterização epidemiológica da brucelose bovina em 15 Unidades da Federação (UF) (Poester et al., 2009). Os dados de prevalência revelaram heterogeneidade entre as prevalências de propriedades, de 0,32% no Estado de Santa Catarina a 41,5% no Estado do Mato Grosso do Sul (Sikusawa et al., 2009; Chate et al., 2009).

As práticas que envolvam a identificação e a eliminação dos animais infectados com a devida indenização dos proprietários para reposição dos animais eliminados fundamentam um programa de controle e erradicação da brucelose bovina (Lage et al., 2008). Nos países desenvolvidos que controlaram a brucelose bovina e tiveram uma diminuição acentuada na incidência de brucelose humana, a erradicação da brucelose foi realizada quando as partes envolvidas se comprometeram em solucionar o problema (Seleem et al., 2010). Um programa neste sentido apresenta enormes restrições em sua implantação, especialmente nos países em desenvolvimento, por envolverem recursos humanos e financeiros nem sempre disponíveis. Em virtude disto, a prevenção da doença pela vacinação dos animais susceptíveis assume um papel relevante, consituindo-se uma prioridade no PNCEBT (BRASIL, 2006; Lage et al., 2008).

O PNCEBT, desde sua implementação, apoiou-se em medidas como vacinação e controle de trânsito animal, caracterizadas como medidas compulsórias. A prioridade foi a vacinação de bezerras com idade entre 3 e 8 meses com a amostra B19, sendo permitido após esta idade o uso

de vacinas que não interfiram nos testes diagnósticos empregados (BRASIL, 2006). Deste modo em 2007, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 33, estabeleceu as condições para a vacinação de fêmeas bovinas utilizando a amostra vacinal RB51, não indutora de anticorpos aglutinantes. 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). Entre as medidas voluntárias constam a certificação de propriedades livres da brucelose bovina, monitorização certificada de bovinos de corte, abate de animais positivos em frigoríficos e na formação de recursos humanos para atuar no programa (BRASIL, 2006).

Para o controle efetivo da brucelose animal são necessários procedimentos como: vigilância epidemiológica ativa para identificar animais e rebanhos infectados, diagnóstico correto para evitar a transmissão dentro do rebanho e eliminação de reservatórios (as fontes de infecção), a fim de proteger os animais susceptíveis dentro do rebanho. Em conjunto também devem ser aplicadas medidas para prevenir a reintrodução da doença. Em áreas livres de brucelose, o risco de introdução da doença por meio de trânsito animal precisa ser eliminado. O trânsito de animais infectados deve ser proibido e as permissões de importação são dadas a propriedades certificadas como livre de brucelose (Gwida et al., 2011; WHO, 2009).

Países como Dinamarca, Finlândia, Suécia, Noruega, Áustria, Alemanha, Holanda e Luxemburgo, são considerados livres de brucelose bovina, e outros países a exemplo França, Grécia, Portugal e Espanha receberam apoio da União Européia para avançar em programas de erradicação (Godfroid e Kasbohrer, 2002). Vale ressaltar que a brucelose foi controlada e, por vezes, erradicada dos reservatórios animais, em países desenvolvidos, pela aplicação estrita de medidas de controle sanitário, tais como realização dos testes de diagnóstico, com eliminação dos animais infectados e desinfecção do ambiente (Seleem et al., 2010).

Nos países em desenvolvimento, controlar a infecção animal exige um maior esforço e as dificuldades concentram-se em construir uma infra-estrutura com educação sanitária para conscientizar as pessoas sobre os riscos da brucelose; dispor de laboratórios com instalações adequadas e pessoas treinadas para coletar e realizar os testes diagnósticos; além de manutenção de registros e programas de vigilância ativa. Sua erradicação é ainda mais difícil nestes países por causa de recursos limitados para indenizar os pecuaristas, já que o descarte dos animais infectados do rebanho é imprescindível (Seleem et al., 2010).

3.2 Diagnóstico de *Brucella* spp.

A propagação da brucelose entre os rebanhos geralmente ocorre através da introdução de animais infectados e assintomáticos (Adone e Pasquali, 2013). Podendo ocorrer pela exposição

de vacas não gestantes a pequenas quantidades de bactérias, com possibilidade de tornarem-se portadoras assintomáticas. Ou na infecção de crias de vacas brucélicas durante a gestação, com a persistência de *Brucella* spp. em alguns órgãos, podendo estes eliminar o agente etiológico durante a vida adulta. Os bezerros podem se infectar, de forma transitória ou não, com a ingestão de leite contaminado, albergando o agente nos linfonodos associados ao trato gastrointestinal, e excretar *Brucella* spp. nas fezes (OMS, 1986). Por esta razão é essencial a detecção correta e precisa destes animais e de possíveis portadores dentro do rebanho. Um diagnóstico definitivo deve ser apoiado em testes laboratoriais, incluindo testes sorológicos ou testes de diagnóstico direto (Nielsen e Ewalt, 2004).

Os métodos de diagnóstico para brucelose incluem testes diretos, envolvendo análise microbiológica, detecção de DNA pela PCR ou imunohistoquímica, enquanto a base de testes indiretos correspondem à detecção de resposta imunológica contra *Brucella* spp. presente em fluidos corporais, resposta humoral ou celular, que são aplicadas quer *in vitro* (principalmente no leite ou sangue) ou *in vivo* (teste de alergia). A escolha das estratégias diagnósticas e de quais ensaios utilizar dependerá da situação epidemiológica da brucelose nos animais susceptíveis (bovinos e animais selvagens) em um país ou uma região (Adone e Pasquali, 2013; Godfroid et al., 2010).

O diagnóstico indireto, direcionado para detecção de anticorpos contra antígenos específicos de *Brucella* spp., compõe a principal estratégia empregada nos programas de controle e erradicação da brucelose (Adone e Pasquali, 2013). O principal antígeno envolvido nos testes é a cadeia O, componente do lipopolissacarídeo constituinte da parede celular de *Brucella* spp. que possui alta imunogenicidade (Schurig et al., 2002). O meio mais rápido, barato e menos laborioso com indicação confiável de exposição à *B. abortus* é a detecção de anticorpos no soro ou leite (Lage et al., 2008). Os testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose bovina devem ser reconhecidos internacionalmente e padronizados contra provas de soro anti-*B. abortus* (OIE, 2012). A ampla quantidade de testes indiretos disponíveis para o diagnóstico de brucelose permite que cada país, de acordo com suas disponibilidades e características, escolha aqueles que melhor se adaptem à sua estratégia (BRASIL, 2006).

No diagnóstico indireto, a combinação de testes utilizados em série, costuma ser a melhor estratégia, como visto em países com avanços significativos no combate a brucelose. Essa estratégia se direciona com a escolha de um teste de triagem de fácil execução, barato e de boa sensibilidade, seguido de um teste confirmatório, realizado apenas nos animais que resultarem positivos no teste anterior. Para confirmação do resultado, o teste utilizado geralmente é mais elaborado, com melhor especificidade que o teste de triagem, que precisa também possuir boa sensibilidade (OIE, 2012). No Brasil, as provas sorológicas definidas no PNCEBT para diagnóstico

da brucelose bovina são o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e teste do Anel em Leite (TAL) para triagem, para animais e rebanhos, respectivamente (BRASIL, 2006). A confirmação dos resultados positivos individuais é feita pela combinação do Teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) com o Teste de Redução pelo 2-Mercaptoetanol (2-ME), pela reação de Fixação de Complemento (RFC) ou Teste de Polarização Fluorescente (BRASIL, 2015).

O AAT (rosa de bengala, Card-Test®) é uma prova qualitativa rápida, prática e de boa sensibilidade que têm sido bastante utilizado como teste de triagem. Esta prova é muito útil, mas tende a ser muito sensível, especialmente em animais vacinados com B19, apresentando altas taxas de falso-positivos, por isso animais reagentes nesta prova devem ter o diagnóstico confirmado por outros testes (Lage et al., 2008; BRASIL, 2006).

O TAL foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, em função da sensibilidade do teste. É um teste de grande valor, não só para se detectar rebanhos infectados, como também para o monitoramento de rebanhos leiteiros livres de brucelose. Esta prova tem limitações, como resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mastites ou de animais em início de lactação (BRASIL, 2006).

Entre as provas confirmatórias, estão o teste de redução pelo 2-ME associado ao teste de SAL, provas quantitativas seletivas, entre as quais a primeira detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica, e a segunda detecta IgM e IgG (BRASIL, 2006). Outra prova definida como confirmatória é a fixação do complemento, considerada como uma das provas com melhor sensibilidade e especificidade (Emmerzaal et al., 2002). Este teste é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais. No entanto, por ser um teste trabalhoso e complexo, exige treinamento e laboratório bem equipado para sua execução (Lage et al., 2008; BRASIL, 2006). O Teste de Polarização Fluorescente pode ser utilizado como teste único ou como teste confirmatório em animais reagentes ao teste do AAT ou inconclusivos ao teste de redução pelo 2-ME (BRASIL, 2015). Este teste apresenta bom desempenho pela alta sensibilidade, alta especificidade e alta reprodutibilidade interlaboratorial (Mathias et al., 2010).

Como diagnóstico direto destaca-se a imunohistoquímica, o isolamento bacteriano e a PCR. A imunohistoquímica é uma ferramenta direta de diagnóstico que pode ser realizada em material de aborto mesmo após a fixação em formol e que permite tanto a identificação do agente como a visualização de aspectos microscópicos do tecido examinado, sendo uma ferramenta muito útil para estudar a patogênese da doença (Carvalho Neta et al., 2010; BRASIL, 2006). No entanto, o padrão ouro para o diagnóstico de brucelose é o isolamento bacteriano. O isolamento e identificação da *B. abortus* podem ser feitos a partir de material de aborto (feto, conteúdo

estomacal de feto, placenta) ou secreções (Alton et al., 1988). A forma clássica de identificação das bactérias do gênero *Brucella* tem como base as 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, para isolar *Brucella* spp. é necessário dispor de tempo e uso intensivo de recursos. Este método exige laboratórios especializados com nível 3 de biossegurança, que requerem, além do treinamento e experiência, segurança na manipulação com o agente, pois o manuseio envolve risco de infecção (Godfroid et al., 2010; CDC, 2009). A fim de evitar estes inconvenientes, métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) estão se tornando muito úteis para o sucesso dos estudos envolvendo *Brucella* spp. (Yu e Nielsen, 2010). Além de identificar, algumas dessas técnicas permitem também a classificação das espécies de *Brucella* envolvidas nas infecções (Bricker e Halling, 1995; Lopez- Goni et al., 2008). A PCR detecta um segmento de DNA específico de *B. abortus* em material suspeito, como aborto, secreções e excreções, apresentando-se como alternativa ao isolamento. É uma técnica bastante sensível e específica, mas requer equipamentos sofisticados e pessoas treinadas (Bricker, 2002; BRASIL, 2006).

O isolamento de *Brucella* spp., a detecção de DNA e a imunohistoquímica são os métodos que permitem certeza do diagnóstico (Carvalho Neta et al., 2010). Na biotipificação e gonotipagem são fornecidas informações epidemiológicas valiosas que permitem o rastreamento de infecções (Whatmore et al., 2006; Van Belkum, 2007).

As bactérias do gênero *Brucella* apresentam alta homologia de DNA (Verger et al., 1985). Embora as bactérias do gênero *Brucella* sejam consideradas monomórficas, apresentando alta homogeneidade na hibridização de DNA-DNA, após o sequenciamento do genoma de *B. melitensis* 16M (DeIVecchio et al., 2002), *B. suis* 1330 (Paulsen et al., 2002) e *B. abortus* 9-941 (Halling et al., 2005) foi possível identificar sequências de DNA variáveis com potencial utilização como marcadores para o diagnóstico e diferenciação genotípica (Bricker et al., 2003). O genoma bacteriano possui regiões de nucleotídeos que se repetem em sequências codificantes ou não, quando estas repetições estão adjacentes umas às outras e seu número no mesmo *locus* varia entre os isolados, as respectivas regiões genômicas são chamadas números variáveis de repetições em tandem (*Variable Number of Tandem Repeat – VNTR*). Os *VNTR* têm se mostrado úteis marcadores moleculares epidemiológicos pela sua alta variabilidade, utilizados com sucesso para diferenciar linhagens ou genótipos de uma mesma espécie (Van Belkum, 2007).

3.3 Epidemiologia Molecular e Análise Múltiplos loci de VNTR (MLVA)

Os métodos de tipificação têm se tornado indispensáveis para o estudo da epidemiologia da maioria dos patógenos microbianos. Diferentes sistemas de tipificação têm sido aplicados para

compreensão das relações epidemiológicas de alguns micro-organismos (Traub et al., 2005; Ranjbar et al., 2014).

A genotipagem microbiana ou “*DNA fingerprint*” é importante para o esclarecimento de surtos de doenças infecciosas, além de permitir o rastreamento de patógenos virulentos ou multiresistentes (Van Belkum, 2003). A identificação de espécies e genótipos a partir de isolados de *Brucella* spp. é importante para a vigilância epidemiológica; investigação de surtos em regiões endêmicas e livres; e distinguir os casos de reintrodução da doença e de recidivas, influenciando assim as decisões a serem tomadas (Kattar et al, 2008). A identificação baseada em *VNTR*, ajuda na diferenciação genotípica entre amostras por permitir a detecção de microevoluções, deleções ou adições no genoma bacteriano (Whatmore et al., 2006; Bricker et al., 2003). A combinação entre sequências homólogas consecutivas permite o desenvolvimento de ensaios de alta resolução de discriminação entre linhagens, pois vários alelos podem ser observados entre amostras de um mesmo micro-organismo (Vergnaud e Pourcel, 2006).

Os *VNTR* consistem em ocorrências subsequentes perfeitas ou imperfeitas de uma unidade de repetição de DNA, que podem apresentar diferentes alelos e variações entre amostras de um mesmo micro-organismo. Estas sequências de DNA são encontradas em organismos procariotos e eucariotos e são, geralmente, classificados em: satélites, que possuem megabases de DNA; minissatélites, quando as unidades de repetição estão entre 100-600 pb, abrangendo centenas de pares de bases; e microssatélites, com sequências menores, quando as unidades de repetição estão entre 1-8 pb, abrangendo algumas dezenas de nucleotídeos (Vergnaud e Pourcel, 2006).

A partir da caracterização do número de repetições em cada *locus* com *VNTR* podem ser observadas modificações genéticas entre amostras de uma mesma espécie, as quais podem ser utilizadas para construir uma identidade genética para isolados bacterianos (Whatmore et al., 2006). Assim, técnicas moleculares que se baseiam na detecção *VNTR* são adequadas para investigar surtos de doenças individuais e para rastreamento de transmissão de agentes, com casos epidemiologicamente relacionados, a partir de amostras que compartilham alelos de *VNTR*, detectados a partir de ensaios ou análises de um conjunto de *loci* com *VNTR*. A combinação de vários alelos fornecem níveis de discriminação entre isolados, dentro e entre espécies, sem precedentes como observado para *Brucella* spp. (Whatmore, 2009).

Os primeiros trabalhos com uso de marcadores de *VNTR* altamente discriminatórios para tipificação de *Brucella* spp. foram realizados por Bricker et al. (2003) e denominados de “*HOOFprints*” (Whatmore et al., 2009). Também outros grupos de pesquisa investigaram marcadores de *VNTR*, e caracterizaram dentro dos *loci* com *VNTR* marcadores moderadamente variáveis,

constituídos de minissatélites, e hipervariáveis ou mais discriminatórios, formados por microssatélites (Le Fléche et al, 2006; Al Dahouk et al., 2007).

Ainda que o isolamento bacteriano com uso de ensaios clássicos seja importante para identificação das amostras de *Brucella* spp., a análise de múltiplos *loci* com VNTR, que tem como alvos múltiplas regiões de repetição com taxas de mutação mais elevadas do que outros marcadores genômicos, tem maior poder de discriminação entre os isolados (Lé Fleche et al., 2006).

Neste contexto, os novos métodos de genotipagem como Análise de Múltiplos *Loci* de VNTR, MLVA, estão ganhando maior aceitação e aplicação, nos próximos anos certamente serão usados como rotina de genotipagem e determinação de perfis genotípicos, constituindo um método efetivo para epidemiologia molecular (Le Fléche et al., 2006; Whatmore, 2009; Godfroid et al., 2010). Estes *loci* foram selecionados para genotipificação de *Brucella*, constituindo um painel formado por um conjunto de 15 *loci*, composto por oito marcadores com minissatélites e sete marcadores com microssatélites altamente discriminatórios (Le Fléche et al., 2006), foi chamado de MLVA15 e após adição do *locus* Bruce19 (minissatélite) foi denominado MLVA16 (Al Dahouk et al., 2007). Esta técnica tornou-se uma ferramenta útil para identificar genótipos de amostras de *Brucella* spp. e os dados resultantes podem ser utilizados em investigações de rastreamento epidemiológico (Jiang et al., 2011; Kattar et al., 2008).

Os resultados do MLVA dão suporte a classificação atual do gênero *Brucella*, em que os isolados são caracterizados pelo número de VNTR gerando uma impressão digital específica ou “fingerprint”, na qual as amostras são associadas de acordo com a espécie, e ainda gerando um discriminação satisfatória entre a espécie (Al Dahouk et al., 2007). Uma grande vantagem desta técnica é a facilidade de intercâmbio de dados. Os dados podem ser resumidos em um arquivo de texto contendo o número de cópias em repetição para cada *locus* e cada espécie. Estes dados podem ser armazenados em bancos de dados de cada instituição, também podem ser acessados e consultados através do banco de informações compartilhado na internet (Lé Fleche et al., 2006). Salienta-se que esta técnica é considerada adequada para discriminação de um grande número de amostras (Vergnaud e Pourcel, 2006; De Santis et al., 2011).

Outro painel de VNTR também proposto para genotipificação de *Brucella* spp. é composto por microssatélites octaméricos chamados HOOOF-print (Bricker et al., 2003). Os HOOOF-print são marcadores de genotipificação de alta resolução e discriminação entre os isolados (Bricker et al. 2003; Whatmore et al., 2006). Com o aumento dos estudos utilizando HOOOF-print, tem sido descritos um número cada vez maior de marcadores altamente polimórficos, em conjunto aos anteriormente descritos (Whatmore et al., 2006; Almendra et al., 2009; Whatmore et al; 2009; Whatmore et al.; 2015). Vale ressaltar, que é necessário uma seleção

de marcadores para serem utilizados nas diversas situações, pois os *loci* selecionados têm diferentes taxas de evolução, dando flexibilidade de uso dos marcadores correspondentes a natureza da população a ser examinada (Whatmore et al., 2006). A associação de *HOOF-print* ao *MLVA16* pode aumentar a capacidade de discriminação e de rastreamento do ensaio de *MLVA* (Her et al., 2009).

MLVA16 demonstrou ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de estudos epidemiológicos de *Brucella* spp. (Álvarez et al., 2011), na caracterização de novas espécies de *Brucella* (Maquart et al., 2009; Scholz et al., 2008), na avaliação de fontes de infecção humana e animal (Marianelli et al., 2008), também na discriminação de pequenas variações genômicas entre as estirpes vacinais (Dornelles et al., 2013).

Na França, foi possível identificar a origem de um surto ocorrido em bovinos a partir do contato com ruminantes silvestres utilizando *MLVA16* (Mick et al., 2014). Demonstrou-se que o mesmo perfil genotípico de *Brucella* spp. que persistia no rebanho de ruminantes silvestres foi encontrado em bovinos daquela região. Este consenso foi formado a partir de um conjunto de informações que permitiram a suspeita da introdução de novos perfis ou mesmo o monitoramento da introdução de novas amostras em rebanhos de contato estreito, auxiliando no esclarecimento deste surto (Mick et al., 2014).

A utilização do *MLVA16* permitiu, em uma área restrita da Itália onde a brucelose ainda é endêmica, observar diferentes genótipos de *B. melitensis* em isolados oriundos de seres humanos. Na qual foi confirmada a infecção adquirida durante uma viagem de um técnico de laboratório pela análise do perfil genotípico dos isolados (Marinelli et al., 2008). Na China, utilizando o *MLVA*, foi possível caracterizar amostras de *Brucella* spp. e esclarecer um caso de brucelose em uma região não endêmica. Foi confirmada a infecção de um técnico de laboratório em Pequim, adquirida por infecção acidental, provavelmente por amostra de um paciente da Mongólia (Jiang et al., 2011). Deste modo, a tipificação através de análise de *VNTR* pode ajudar a diferenciar acidentes laboratoriais de infecções adquiridas durante o lazer ou viagem a uma região endêmica (Marinelli et al., 2008), fornecendo evidências de origem da infecção.

No Brasil o *MLVA* permitiu a análise genética de linhagens vacinais de referência. Após sucessivas passagens *in vitro* de amostras vacinais de *B. abortus* foi comprovada a estabilidade genética das amostras B19 e RB51 (Dorneles et al., 2013). Depois de constatada a estabilidade dos marcadores genéticos que compõem o *MLVA16 in vitro* foi proposto a inclusão da técnica entre os testes utilizados para garantir a qualidade e estabilidade genética das vacinas vivas anti-*Brucella* (Miranda et al., 2013; Dorneles et al., 2013). O uso do *MLVA* como marcadores epidemiológicos está relacionado à sua estabilidade frente a pressão de seleção que ocorre em infecções naturais. Foi demonstrado que há baixa diversidade genética e estabilidade *in vivo* dos

marcadores de *MLVA16* entre isolados de um foco de infecção, mesmo quando avaliados durante um período de 16 meses, quando foram submetidos a pressão seletiva das infecções naturais (Dorneles et al. 2014b).

A genotipificação de 137 amostras de *B. abortus*, isoladas de bovinos no Brasil entre 1977 e 2008, pelo *MLVA16*, revelou em 137 amostras de *B. abortus* pertencentes a várias regiões do Brasil, 89 diferentes genótipos considerados potenciais marcadores epidemiológicos espaciais, dando início ao um banco de genótipos brasileiros depositados no MLVABank Bacterial Genotyping (Minharro et al., 2013).

Portanto, o *MLVA* apresenta-se como uma importante ferramenta na investigação epidemiológica de infecções por *Brucella* spp. com aplicação em programas de controle e vigilância epidemiológica da brucelose para identificação e caracterização de diferentes genótipos (Whatmore et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). A maioria dos critérios recomendados a um teste de tipificação como reprodutibilidade, estabilidade, capacidade discriminatória e concordância epidemiológica são atendidas no *MLVA* (Struelens, 1998). O sucesso dos programas de controle e erradicação de enfermidades está intimamente associado a uma vigilância epidemiológica ativa e permanente (Godfroid e Kasbohrer, 2002). A partir das técnicas de tipificação 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 gênero *Brucella* (Vergnaud e Pourcel, 2006; Whatmore et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de *Brucella abortus*

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 140 amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos do Brasil, entre 2009 e 2013, provenientes do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Neste trabalho foi utilizada uma amostragem de conveniência, utilizando as amostras de *B. abortus* cedidas pelo LANAGRO, atualmente o único laboratório que recebe material do MAPA para isolamento de *B. abortus* no país. Estas amostras foram oriundas de 8 estados: Pará, Mato Grosso, Tocantins, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rondônia, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul (Figura 1).

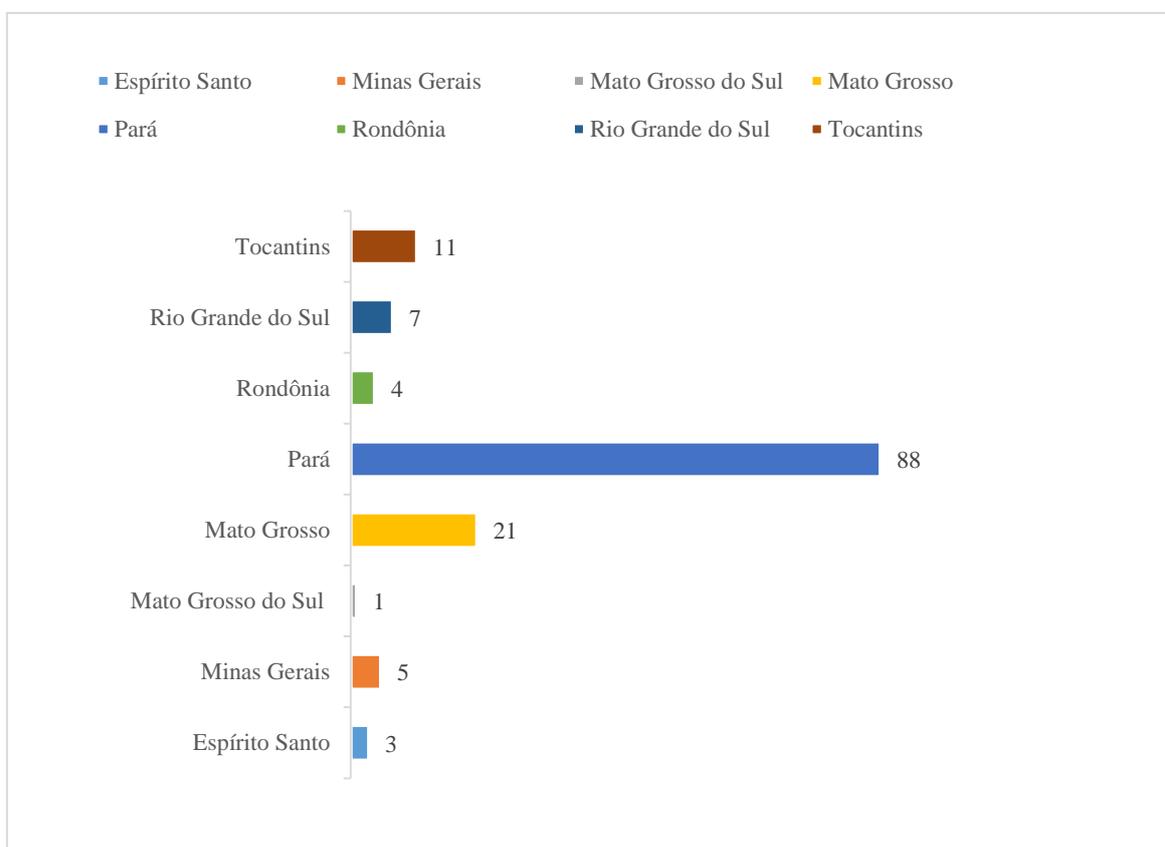


Figura 1 – Distribuição, por Estado, de amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil pelo LANAGRO de 2009 a 2013.

4.2 Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada segundo Pitcher et al. (1989). Para verificar a pureza e determinar a concentração do DNA das amostras foi utilizado a espectrofotometria (Sambrook e Russel, 2001), utilizando NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, UK).

4.3 PCR gênero-específica

O DNA de cada isolado foi submetido a PCR para amplificação do gene *bcs31*, conservado em todas as espécies de *Brucella*, utilizando os iniciadores B4 e B5, descritos por Baily et al. (1992). A amplificação do DNA genômico de cada amostra foi realizado segundo Richtzenhain et al. (2002). Como controle positivo foi utilizada a amostra de referência cedida pelo LANAGRO, *B. abortus* 544 (ATCC 23448), e como controle negativo todos os reagentes do mix de PCR sem o DNA. Os produtos amplificados (223 bp) em todas as reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% em tampão Tris-borato- EDTA (TBE) (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA) e corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Após eletroforese, os géis foram observados a luz ultravioleta e fotografados (L-PIX EX, Loccus Biotecnologia, Brasil). O marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs, EUA) foi utilizado em cada eletroforese.

4.4 PCR espécie-específica

Para diferenciar as espécies de *Brucella* foi utilizado a AMOS PCR (Bricker e Halling, 1994; López-Goñi et al., 2008) com as modificações sugeridas por Orzil et al. (2015), baseado na amplificação da região *IS711*.

Para visualização dos produtos amplificados em todas as reações de AMOS PCR foi utilizado gel de agarose 1,0% em tampão TBE corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Seguida a eletroforese, os géis foram observados sob luz ultravioleta e fotografados (L-PIX EX, Loccus Biotecnologia, Brasil). Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado em cada eletroforese.

4.5 Análise de múltiplos loci de VNTR (MLVA)

Na determinação do perfil genotípico dos isolados de *Brucella* spp., foi utilizado a técnica de análise de múltiplos loci de VNTR conforme descrito por Lé Fleche et al. (2006) (*MLVA15*) e, posteriormente, adaptado por Al Dahouk et al. (2007) (*MLVA16*). Além dos VNTR presentes no *MLVA16*, foram inseridos neste trabalho também os VNTR, *Hoof-print* 3 e 4 (Bruce25 e Bruce20), na análise do perfil genotípico dos isolados (Bricker et al, 2003; Whatmore et al., 2006). Estes marcadores moleculares apresentam alto poder discriminatório entre os isolados. Assim, foram utilizados 18 iniciadores, para diferentes loci de VNTR de *Brucella* spp. (*MLVA*) (Al Dahouk et al., 2007; Le Fléche et al., 2006; Whatmore et al., 2006; Bricker et al, 2003), divididos em três painéis: Painel 1 composto por 8 microssatélites correspondentes aos loci Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55; painel 2 composto pelo painel 2A com minissatélites correspondentes aos loci Bruce18 e Bruce19 e Bruce21 e painel 2B com minissatélites dos loci Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce30; e Painel 3 com os *Hoof-*

print 3 e 4 (Bruce 25 e Bruce 20) (Tabela 1). As unidades de repetição em *tandem* dos 18 *loci* avaliados variaram de 3 pb a 134 pb.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nos painéis 1, 2A e 2B do *MLVA16*, e painel 3(*HOOF-print 3 e 4*)

<i>Locus</i>	Iniciadores	Painel	Un. de repetição	Referência
Bruce06	5'ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG3' 5'GCGTGACAATCGACTTTTTGTC3'	1	134bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce08	5'ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC3' 5'ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC3'	1	18bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce11	5'CTGTTGATCTGACCTTGCAACC3' 5'CCAGACAACAACCTACGTCCTG3'	1	63bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce12	5'CGGTAATCAATTGTCCCATGA3' 5'GCCAAGTTCAACAGGAGTTTC3'	1	15bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce42	5'CATCGCCTCAACTATACCGTCA3' 5'ACCGCAAAATTTACGCATCG3'	1	125bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce43	5'CATCGCCTCAACTATACCGTCA3' 5'ACCGCAAAATTTACGCATCG3'	1	12bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce45	5'ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG-3' 5'CGGGTAAATATCAATGGCTTGG3'	1	18bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce55	5'TCAGGCTGTTTCGTCAGTCTT'-3 5'AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT3'	1	40bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce18	5'TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT3' 5'GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG3'	2A	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce19	5'GACGACCCGGACCATGCTT3' 5'ACTTCAACCGTAACGTCGTGGAT3'	2A	3bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce21	5'CTCATGCGCAACCAAAAACA3' 5'ATCTCGTGGTTCGATAATCTCATT3'	2A	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce04	5'TGACGAAGGGAAGGCAATAAG3' 5'CGATCTGGAGATTATCGGGAAG3'	2B	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce07	5'GCTGACGGGAAGAACAATCTAT3' 5'ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA3'	2B	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce09	5'GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC3' 5'GGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG3'	2B	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce16	5'ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT-3' 5'GGCCATGTTCCGTTGATTTAT3'	2B	8bp	Lé Fleche et al., 2006
Bruce30	5'TGACCGCAAAACCATATCCTTC3' 5'TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG3'	2B	8bp	Lé Fleche et al., 2006
<i>HOOF-print3</i> (Bruce25)	5'CAGGCGCTTGAGGATGAGGCGGCA3' 5'GGGGCARTARGGCAGTATGTTAAGGGAATAGGG3'	3	8bp	Bricker et al., 2003
<i>HOOF-print4</i> (Bruce20)	5'GCAGAATTTTCGAGGCATTCGGCGATG3' 5'GGGGCARTARGGCAGTATGTTAAGGGAATAGGG3'	3	8bp	Bricker et al., 2003

As reações de PCR para o *MLVA16* foram realizadas com um volume final de 12 µL contendo: tampão [50 mM Tris, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3]; 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 1 µM de cada iniciador; 1,5 mM de MgCl₂; 1 unidade de DNA polimerase (Phoneutria, Brasil) e 50 ng de DNA. Nas reações de PCR que não apresentaram amplificação foram realizadas repetições com acréscimo de betaína 5M (SIGMA Aldrich, USA). As amplificações seguiram de acordo com os 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. As reações de PCR para os *HOOF-print* 3 (Bruce25) e *HOOF-print* 4 (Bruce20) foram realizadas segundo Bricker et al. (2003) com modificações, usando um volume final de 12 µL contendo: tampão [50 mM Tris, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3]; 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 1 µM de cada iniciador; 2,5 mM de MgCl₂; 1 unidade de DNA polimerase (Phoneutria, Brasil) e 50 ng de DNA. As amplificações seguiram os parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 32 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, seguidos de um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% para o painel 1 e 3% para os painéis 2A, 2B e 3 em tampão Tris-borato-EDTA 1X (TBE) (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA). Os géis obtidos foram corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), visualizados sob luz ultravioleta (UV) e fotografados (L-PIX EX, Loccus Biotecnologia, Brasil). Foram utilizados os marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England, EUA) para o painel 1 e 25 bp Step Ladder (Promega, EUA) para o painel 2 e *HOOF-print*, nas eletroforeses de acordo com a unidade de repetição de cada *locus*. Como controle foi usado a amostra de *B. melitensis* 16M (ATCC 23456) e a amostra de *B. abortus* RB51 nas eletroforeses dos painéis 2A, 2B e 3.

4.6 Índice de diversidade

A diversidade genética dos isolados foi determinada utilizando Índice de Diversidade de Hunter e Gaston (HGDI) (Hunter e Gaston, 1988). O HGDI foi calculado utilizando o programa Discriminatory Power (D), com acesso no endereço: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php

4.7 Análise dos genótipos

A partir da imagem digital de cada gel, foi estimado o tamanho dos fragmentos encontrados para cada amostra em cada *locus* com o auxílio do programa BioNumerics versão 7.5 (Applied Maths, Bélgica). O tamanho estimado para cada banda foi então convertido para o

número de unidades de repetições para cada *locus*, segundo Le Flèche et al. (2006). Do produto amplificado foram subtraídas as regiões flaqueadoras, sendo o resultado dividido pelo tamanho da unidade de repetição do respectivo locus para obtenção do alelo. Com base no número de unidades de repetições de cada *locus* foram analisadas as relações entre as amostras no painel 1 (*MLVA8*); nos painéis 1, 2A e 2B (*MLVA16*); nos painéis 1, 2A e 2B (*MLVA16*) associado ao painel 3 (*HOOF-print 3* e *HOOF-print 4*). Em cada ensaio, com auxílio do software BioNumerics 7.5, foram realizadas análises dos conglomerados e complexos clonais. Para facilitar a visualização da formação de agrupamentos ou relações entre as amostras foram gerados dendrogramas, utilizando coeficiente categórico e método de ligação de média entre grupos (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean - UPGMA). A partir dos dados de cada análise também foi possível gerar uma *Minimum Spanning Tree* (MST), calculada utilizando UPGMA associado com a regra de prioridade e a reamostragem por bootstrap utilizando o software BioNumerics 7.5.

Os genótipos gerados a partir da associação do número de repetições encontrados em cada um dos *locus* do *MLVA8* e dos painéis 1, 2A e 2B do *MLVA16* foram comparados aos depositados no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.upsud.fr/MLVAnet/>).

5. RESULTADOS

5.1 PCR Gênero-Específica e PCR Espécie-Específica

As 140 amostras foram confirmadas como *Brucella* spp. pela PCR descrita por Baily et al. (1992) (Figura 2).

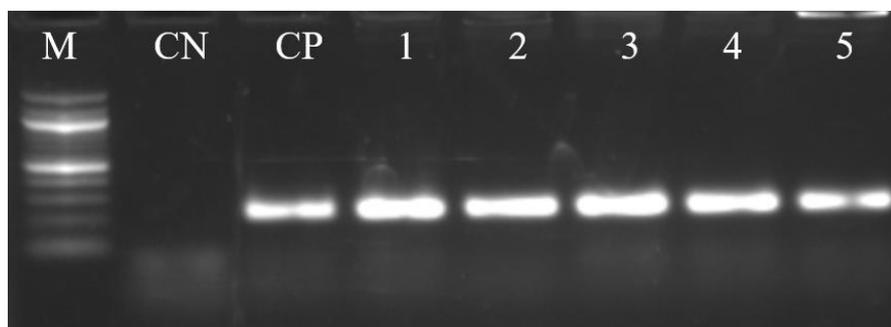


Figura 2 – Gel de agarose a 1% mostrando amplificação, pela PCR gênero-específica para *Brucella* sp. corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Canaleta M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs); canaleta CN: controle negativo, canaleta CP: controle positivo (amostra de referência 544), canaletas 1, 2, 3, 4, 5: amostras isoladas confirmadas como pertencentes ao gênero *Brucella*.

As 140 amostras foram confirmadas como *B. abortus* pela AMOS-PCR (espécie-específica) descrita por (Orzil et al., 2015).

5.2 MLVA e HOOF-print

5.2.1 MLVA8

A análise dos *loci* que compõem o *MLVA8* revelou a existência de oito diferentes genótipos entre as amostras de *B. abortus*, cinco destes já descritos e depositados no *MLVAbank* for Bacterial Genotyping (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/query3.php>): 28, 32, 33, 40 e 112; e três genótipos não descritos, denominados neste trabalho de 112A, 28A e 28B (Tabela 2), por sua proximidade aos genótipos já descritos e depositados no *MLVAbank*. No genótipo 112A foi observado deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce11 em relação ao genótipo 112; no genótipo 28A foi observado a deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce08 e no genótipo 28B foi observado a deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce12 em relação ao genótipo 28 (Tabela 2).

O genótipo mais frequente entre os isolados brasileiros nesta amostragem foi o genótipo 28 [75% (105/140)], seguido pelo genótipo 40 [18,6% (26/140)], formando dois grandes conglomerados (Figura 3). Os outros genótipos representaram juntos 6,4% das amostras: 32 (2/140), 33 (1/140), 112 (1/140), 112A (2/140), 28A (2/140) e 28B (1/140). O genótipo 28, encontrado em sete estados, foi o mais comum no Espírito Santo (3), Minas Gerais (5), Rio Grande do Sul (7), seguido pelos Estados de Rondônia (3/4), Tocantins (8/11), Pará (66/88) e

Mato Grosso (13/21). O genótipo 40 foi observado no Pará (19/88), Mato Grosso (5/21) e Tocantins (2/11). O genótipo 32 foi observado em Rondônia (1/4) e Mato Grosso (1/21). O genótipo 33 foi observado apenas no Pará (1/88) e o 112 somente no Tocantins (1/11). O genótipo 112A foi observado no Mato Grosso do Sul (1) e Pará (1/88), enquanto o 28A somente no Mato Grosso (2/21) e o 28B no Pará (1/88), como visto na Figura 3.

Tabela 2. Genótipos e o número de representantes por perfil genotípico descritos no *MLVA8*

Genótipo	<i>MLVA8</i>								N de amostras
	Bruce06	Bruce08	Bruce11	Bruce12	Bruce42	Bruce43	Bruce45	Bruce55	
28	4	5	4	12	2	2	3	3	105
32	4	5	4	12	1	2	3	3	2
33	3	5	4	12	2	2	3	3	1
40	3	5	3	12	2	2	3	3	26
112	4	5	3	12	2	2	3	3	1
112A	4	5	2	12	2	2	3	3	2
28A	4	4	4	12	2	2	3	3	2
28B	4	5	4	11	2	2	3	3	1

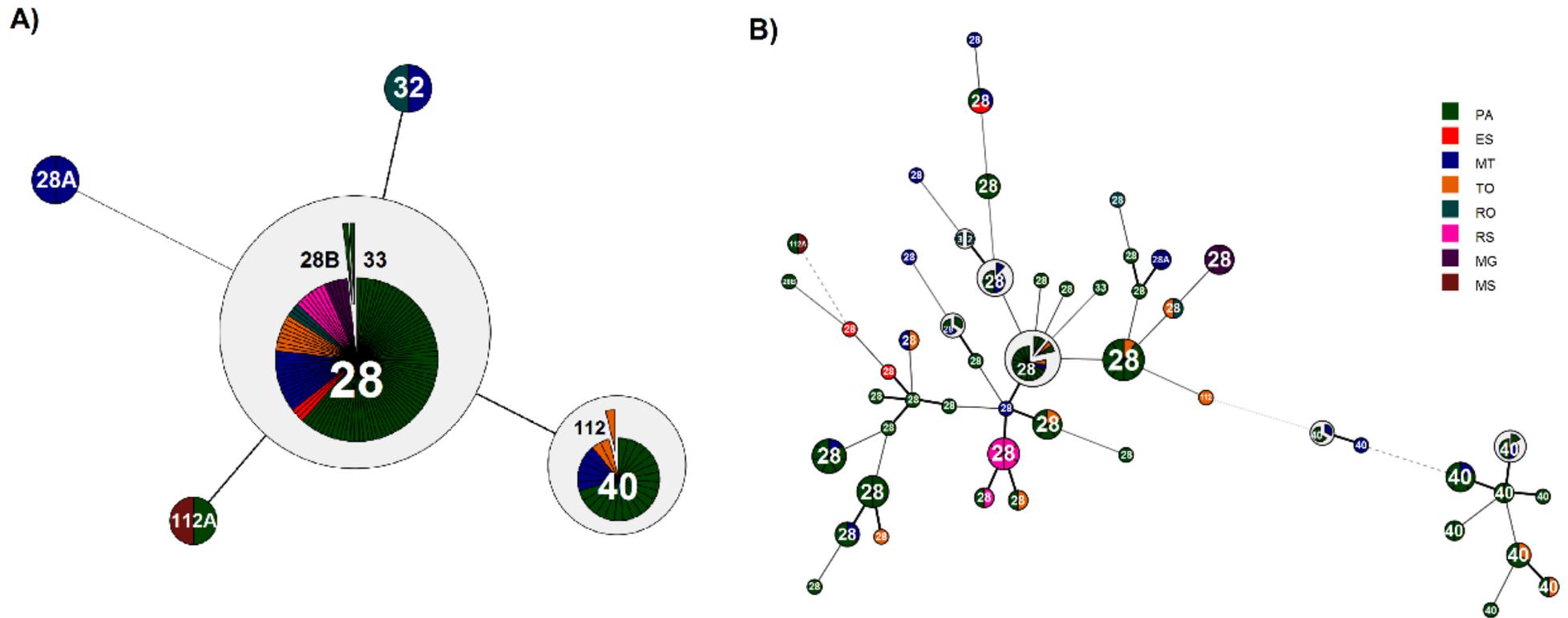


Figura 3. *Minimum Spanning Tree* (MST) de isolados bovinos de *B. abortus* usando os dados de *MVLA8* e *MLVA16*. A MST é apresentada com a maior pontuação geral de confiabilidade e foi calculada utilizando UPGMA associado com a regra de prioridade e a reamostragem por bootstrap para amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil de 2009 a 2013. A) Os números em cada complexo clonal representam os genótipos pelo *MLVA8*. B) Os números em cada complexo clonal representam os genótipos pelo *MLVA8*, utilizando os dados do *MLVA16*. As informações sobre a origem dos isolados estão discriminadas por cores.

5.2.2 MLVA16

No *MLVA16* (painéis 1, 2A e 2B) foram identificados 58 genótipos distintos, visualizados no dendograma da Figura 4. Destes, três genótipos já haviam sido descritos para isolados brasileiros de *B. abortus* (Minharro et al., 2013) e 55 são genótipos ainda não relatados. Os genótipos idênticos aos descritos anteriormente no Brasil por Minharro et al. (2013) e identificados neste estudo são D (7/140), E (3/140) e J (10/140) (Tabela 3). Os genótipos descritos primariamente neste estudo foram denominados de CZ a FE, seguindo a nomenclatura definida por Minharro et al. (2013), no primeiro estudo realizado no país com esta finalidade.

Na comparação dos perfis genotípicos identificados no *MLVA16* aos já depositados no banco de dados MLVAbank 2016 foi possível observar que 18 genótipos, representados por 27 amostras, apresentaram diferenças nos *loci* do painel 1 ou diferenças maiores que 2 unidades de repetição nos *loci* do painel 2 (Tabela 3). Em função das diferenças em relação aos genótipos depositados no MLVAbank 2016 terem ocorrido em *loci* mais conservados (painel 1) ou serem maiores que duas unidades de repetição em *loci* mais discriminatórios (painel 2), estes perfis genotípicos foram considerados muito distantes dos já identificados e depositados no MLVAbank.

Entretanto, entre as amostras analisadas, 113 possuíam perfil genotípico idêntico ou muito próximo a genótipos já descritos para isolados brasileiros depositados no MLVAbank. Os genótipos foram considerados como próximos quando as diferenças entre os perfis genotípicos concentraram-se em uma unidade de repetição (deleção ou adição) nos *loci* do Painel 2 (A e B), Bruce04, Bruce07, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21 e Bruce30. Deste modo, foram identificados 37 perfis genotípicos com proximidade aos já depositados, representados por 93 amostras: 42 amostras apresentaram diferença de uma unidade de repetição em um *locus*; 45 possuíam diferença de uma unidade de repetição em dois *loci*; cinco amostras apresentaram diferença de uma unidade de repetição em três *loci* e uma amostra apresentou diferença de uma unidade de repetição em quatro *loci*.

Tabela 3. Diferenças entre os perfis genotípicos de *B. abortus* isolados de 2009 a 2013 e isolados de 1977 a 2008

	Painel 1 ou Painel 1 e 2 ^a	Painel 2 ^b	Idêntico ^c	Total
N de genótipos	18 (31%)	37 (63,8%)	3(5,2%)	58 (100%)
N de amostras	27 (19,3%)	93 (66,4%)	20 (14,3%)	140 (100%)

^a Diferenças de uma unidade de repetição nos *loci* do painel 1 ou diferenças maiores que 2 unidades de repetição nos *loci* do painel 2

^b Diferenças de uma unidade de repetição (deleção ou adição) nos *loci* do Painel 2

^c Genótipos sem diferenças

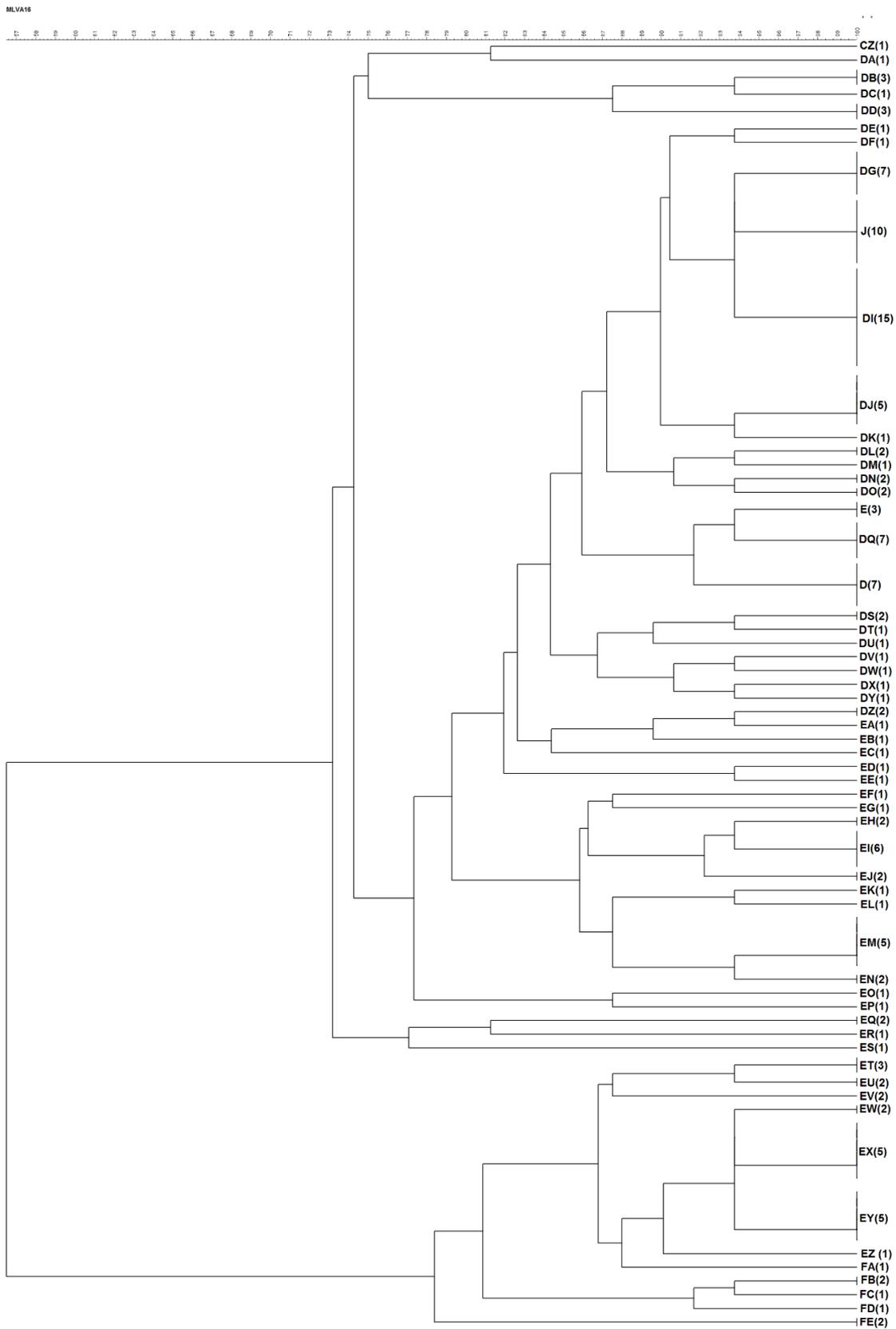


Figura 4. Dendrograma obtido a partir da análise dos genótipos das 140 amostras isoladas de *B. abortus* pelo *MLVA16*. Genótipos e número de representantes por genótipo.

Neste estudo o genótipo D (7/140), foi encontrado nos Estados do Pará (6/7) e Mato Grosso (1/7), o genótipo E (3/140) foi encontrado nos Estados do Pará (2/140) e Mato Grosso (1/140) e o genótipo J (10/140) foi encontrado em municípios do sul do Estado do Pará (9/140) e Tocantins (1/140) (Figura 5).

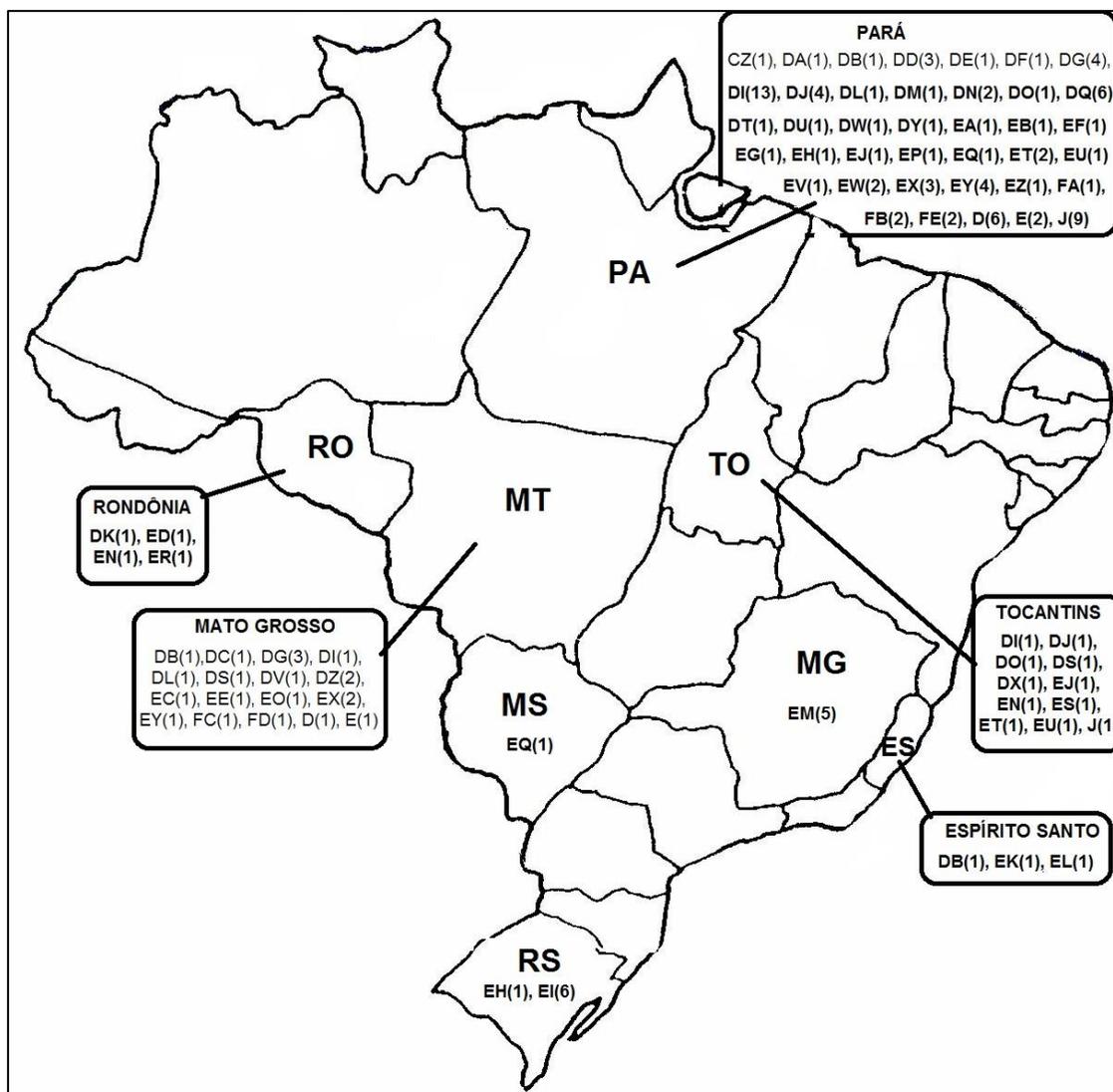


Figura 5. Distribuição dos genótipos obtidos a partir do *MLVA16* de amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil entre os anos de 2009 a 2013. Em parênteses está descrito o número de representantes de cada genótipo por estado.

Os genótipos mais frequentes encontrados neste estudo estão listados na Tabela 4, onde foram destacadas as informações como número de amostras, frequência, origem dos genótipos com mais de um representante, genótipo de proximidade, *locus* ou *loci* observada adição ou deleção de unidades de repetição, origem das amostras de proximidade. Nos perfis genotípicos que apresentaram-se próximos a genótipos já depositados no MLVAbank, esta proximidade foi identificada somente em genótipos já descritos em isolados brasileiros (Minharro et al., 2013).

O genótipo mais frequente descrito neste trabalho foi DI [10,8% (15/140)], encontrado no Pará (13/15), Tocantins (1/15) e Mato Grosso (1/15), diferente do genótipo J, já descrito nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina pela adição de uma unidade de repetição no *locus* Bruce19 (Tabela 4). Em seguida, os genótipos mais observados foram o genótipo J [7,1%(10/140)], identificado nos estados do Pará (9/10) e Tocantins(1/10) e o genótipo D [5%(7/140)] identificado nos Estados do Pará e Mato Grosso, este encontrado anteriormente nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. O genótipo DG [5%(7/140)] foi identificado nos Estados do Pará e Mato Grosso e apresenta uma deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce21 comparado ao genótipo AM, já descrito no Rio Grande do Sul (Tabela 4).

Os genótipos que apresentaram seis representantes (4,3%) por genótipo foram o DQ que apresentou deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce04 comparado ao genótipo E, descrito no no estado de Minas Gerais (Minharro et al., 2013). O genótipo EI difere do genótipo CG, descrito no Rio Grande do Sul, pela adição de uma unidade de repetição no *locus* Bruce19 e deleção uma unidade de repetição no *locus* Bruce04. Os genótipos com cinco representantes (3,6%) foram os genótipos DJ que mostrou-se diferente do genótipo R, descrito em São Paulo, pela deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce19. O genótipo EX mostrou deleção de uma unidade de repetição nos *loci* Bruce19 e Bruce16 comparado ao genótipo BG, descrito no Pará. O genótipo EY apresentou deleção de uma unidade de repetição nos *loci* Bruce19 e Bruce16 comparado ao genótipo BJ, descrito no Tocantins.

O genótipo EM identificado apenas no Estado de Minas Gerais, difere dos genótipos descritos anteriormente em função de alelos distintos no painel 1, composto por *loci* mais conservados. Os genótipos representados por três isolados (2,1%) foram DB e DD. O genótipo DB apresentou adição de uma unidade nos *loci* Bruce18, Bruce16 e Bruce30, e duas unidades no *locus* Bruce19 comparado ao genótipo AJ identificado anteriormente em Minas Gerais. O genótipo DD apresentou adição de uma unidade no *locus* Bruce18 e duas unidades no *locus* Bruce19 comparado ao BE já descrito em Tocantins. O genótipo ET apresentou deleção de uma unidade de repetição nos *loci* Bruce18 e Bruce19 comparado ao genótipo U, descrito no Pará, Tabela 4.

Os genótipos com dois representantes (1,4%) por genótipo foram DL que apresentou deleção de uma unidade de repetição nos *locus* Bruce19 comparado ao genótipo CM, descrito em São Paulo. O genótipo DN apresentou deleção de uma unidade de repetição nos *loci* Bruce07 e Bruce19 comparado ao genótipo J. Os genótipos que distinguem-se dos genótipos descritos anteriormente por apresentar diferenças maiores que duas unidades de repetição em *loci* no Painel 2 ou diferenças no Painel 1, são: DS, DZ; EJ e EQ. O genótipo DS apresentou adição de 6 unidades no *locus* Bruce19 comparado ao K descrito em Minas Gerais. O genótipo EH apresentou deleção

de uma unidade de repetição no *locus* Bruce19 comparado ao genótipo CG, descrito no Rio Grande do Sul. O genótipo EN apresentou deleção de uma unidade de repetição no *locus* Bruce30 comparado ao genótipo BE, descrito em Tocantins. O genótipo EQ apresentou deleção no *locus* Bruce19 e adição no locus 18 de uma unidade de repetição comparado ao genótipo H, descrito em Minas Gerais. O genótipo EW apresentou deleção no *locus* Bruce19 de uma unidade de repetição comparado ao genótipo U, descrito no mesmo Estado. O genótipo FB apresentou deleção no *locus* Bruce19 e adição no locus 18 de uma unidade de repetição comparado ao genótipo Y, descrito no Pará. O genótipo FE apresentou deleção no *locus* Bruce19 de uma unidade de repetição comparado ao genótipo BY, descrito no Rio Grande do Sul. O genótipo DO apresentou deleção nos *loci* Bruce19 e Bruce07 de uma unidade de repetição comparado ao genótipo J (Tabela 4).

Tabela 4. Genótipos mais frequentes encontrados pelo *MLVA16*, número de representantes por genótipo, frequência, origem da amostra, *locus/loci* de deleção ou adição e origem do genótipo com proximidade

Genótipo	N de representantes	Frequência (%)	Origem (Estado)	Genótipo de proximidade	<i>Locus/loci</i> de deleção ou adição	Origem do genótipo com proximidade
DI ²	15	10,8	PA, TO e MT	J	Bruce19	MG, SP e SC
J ¹	10	7,1	PA e TO	-	-	MG, SP e SC
DG ²	7	5	PA e MT	AM	Bruce21	RS
D ¹	7	5	PA e MT	-	-	MG e RS
DQ ²	6	4,3	PA	E	Bruce04	MG
EI ²	6	4,3	RS	CG	Bruce19 e Bruce04	RS
*EM ²	5	3,6	MG	-	Painel 1	-
DJ ²	5	3,6	PA e TO	R	Bruce19	SP
EX ²	5	3,6	PA e MT	BG	Bruce19 e Bruce16	PA
EY ²	5	3,6	PA e MT	BJ	Bruce19 e Bruce16	TO
E ¹	3	2,1	PA e MT	-	-	MG
DB ²	3	2,1	ES, PA e MT	AJ	Bruce18, Bruce19, Bruce16 e Bruce 30	RS
DD ²	3	2,1	PA	BE	Bruce18 e Bruce19	TO
ET ²	3	2,1	PA e MT	U	Bruce18 e Bruce19	PA
DL ²	2	1,4	PA e MT	CM	Bruce19	SP
DN ²	2	1,4	PA	J	Bruce07 e Bruce19	MG, SP e SC
DS ²	2	1,4	MT e TO	K	Bruce19	MG
*DZ ²	2	1,4	MT	-	Painel 1	-
EH ²	2	1,4	RS e PA	CG	Bruce19	RS
EJ ²	2	1,4	PA e MT	-	Painel 1	-
EN ²	2	1,4	RO e TO	BE	Bruce30	TO
EQ ²	2	1,4	PA e MT	H	Bruce18 e Bruce19	MG
*EU ²	2	1,4	PA e TO	-	Painel1	-
EW ²	2	1,4	PA	U	Bruce19	PA
FB ²	2	1,4	PA	Y	Bruce18 e Bruce19	PA
FE ²	2	1,4	PA	BY	Bruce19	RS

¹ Genótipos D, E e J foram descritos por Minharro et al., 2013.

² Genótipos primeiramente descritos neste estudo.

* Genótipos com distância em *loci* do Painel 1.

Os genótipos com apenas um representante por perfil genotípico que apresentaram diferenças apenas de uma unidade de repetição em um *locus* no painel 2 em relação aos genótipos já descritos foram: DT, DX, DY, EC, EF e FC. Os genótipos DE, DK, DM, DO, DU, DV, DW, ED, EG, EK e EO exibiram diferenças de uma unidade de repetição em dois *loci* do painel 2 em relação aos genótipos depositados no MLVABank 2015, enquanto os genótipos CZ e EV mostraram diferenças de uma unidade de repetição em três *loci* do painel 2. Para o genótipo DA a diferença observada em relação aos perfis genotípicos já descritos foi de uma unidade de repetição em quatro *loci* do painel 2. Diferenças no painel 1 ou painel 1 e 2 na comparação com os genótipos do MLVABank foram observadas em 11 genótipos com apenas um representante: DC, DF, EA,EB, EE, EL, ER, ES, EZ, FA e FD.

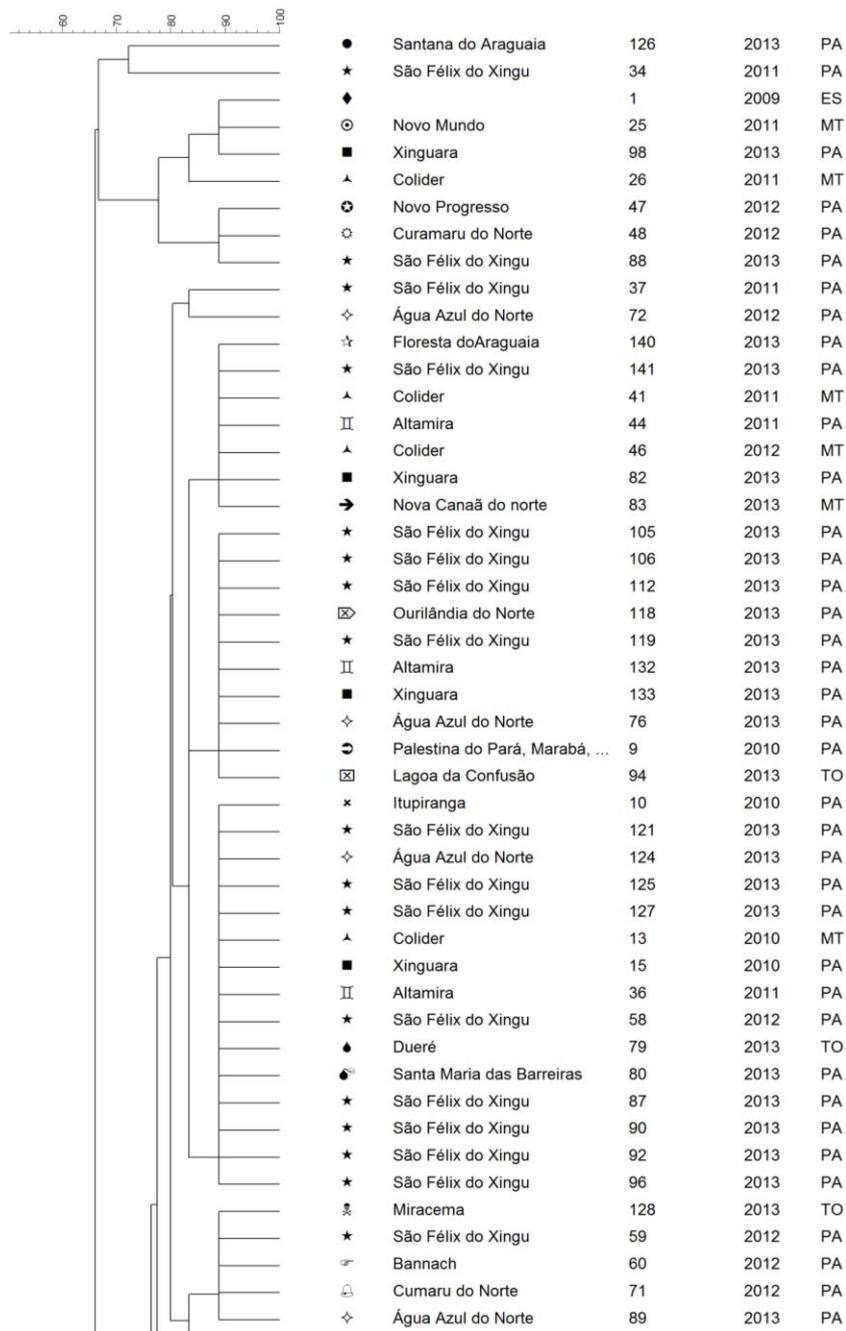
5.2.3 *MLVA16* associado aos *HOOF-print 3* (Bruce25) e *HOOF-print 4* (Bruce20)

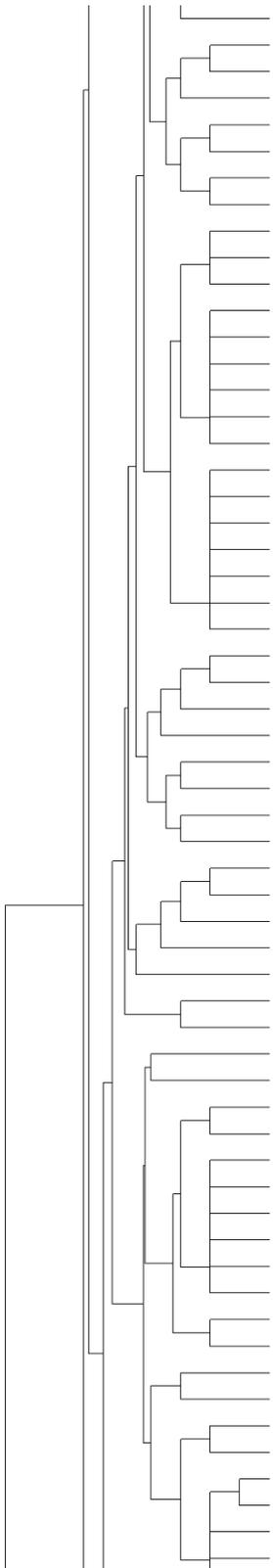
A análise dos *HOOF-print3* (Bruce25) e *HOOF-print4* (Bruce20), marcadores com alto poder discriminatório, mostraram discriminação máxima entre as amostras. Por isso, a associação dos marcadores do *MLVA16* aos *HOOF-print3* (Bruce25) e 4 (Bruce20) revelou um perfil genotípico único para cada amostra, como visto no dendrograma na Figura 6, ao qual não foram evidenciadas relações de agrupamento (140 genótipos para 140 amostras). O índice de diversidade (HGDI) neste caso foi igual a 1 (Tabela 5). Ao considerar a associação do *HOOF-print3* (Bruce25) ao *MLVA16* foram observados 139 genótipos para 140 amostras e a associação ao *HOOF-print4* (Bruce20) ao *MLVA16* foram observados 140 genótipos para 140 amostras (Figura 6).

O índice de diversidade – HGDI (Hunter e Gaston, 1988) foi calculado para *loci* individuais, *MLVA8*, *MLVA16*, *MLVA16* associado ao *HOOF-print3* (Bruce25), *MLVA16* associado ao *HOOF-print4* (Bruce20) e *MLVA16* associado aos *HOOF-print3* (Bruce25) e *HOOF-print4*(Bruce20) (Tabela 5). Os marcadores mais discriminatórios do *MLVA16* pertenceram ao painel 2B: Bruce16, Bruce30 e Bruce04. Em contraste, para os *loci* Bruce43, Bruce45 e Bruce55 foi observado um único alelo em todas as amostras avaliadas (HGDI igual a 0) (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de diversidade (HGDI) calculado para cada *locus* do *MLVA16*, *MLVA8*, *MLVA16*, *MLVA16* associado ao *HOOF-print3* (Bruce25), *MLVA16* associado ao *HOOF-print4* (Bruce20) e *MLVA16* associado aos *HOOF-print3* e 4 (Bruce25 e Bruce20)

<i>VNTR / MLVA</i>	HGDI	Alelos / Genótipos
Painel 1		
Bruce 06	0.3136	2
Bruce 08	0.0284	2
Bruce 11	0.3364	3
Bruce 12	0.0143	2
Bruce 42	0.0284	2
Bruce 43	0	1
Bruce 45	0	1
Bruce 55	0	1
Painel 2A		
Bruce 18	0.3627	3
Bruce 19	0.6413	5
Bruce 21	0.3584	3
Painel 2B		
Bruce 04	0.4119	5
Bruce 07	0.1977	5
Bruce 09	0	1
Bruce 16	0.6885	6
Bruce 30	0.6807	6
<i>MLVA8</i>	0.4051	8
<i>MLVA16</i>	0.9705	58
<i>MLVA16</i> associado ao <i>HOOF-print 3</i>	0.9999	139
<i>MLVA16</i> associado ao <i>HOOF-print 4</i>	1	140
<i>MLVA16</i> associado aos <i>HOOF-print 3 e 4</i>	1	140





⊕	Porto Velho	86	2013	RO
◇	Nova Bandeirantes	12	2010	MT
■	Xinguara	131	2013	PA
⊕	Conceição do Araguaia	66	2012	PA
■	Xinguara	122	2013	PA
⊕	Tucumã	77	2013	PA
⊕	Cristalândia	113	2013	TO
★	São Félix do Xingu	38	2011	PA
●	Santana do Araguaia	42	2011	PA
⊕	Carlinda	43	2011	MT
◇	Água Azul do Norte	81	2013	PA
⊕	Tucumã	103	2013	PA
⊕	Tucumã	104	2013	PA
★	São Félix do Xingu	137	2013	PA
★	São Félix do Xingu	138	2013	PA
★	São Félix do Xingu	97	2013	PA
☞	Rio Maria	99	2013	PA
★	São Félix do Xingu	109	2013	PA
⊕	Colíder	116	2013	MT
II	Altamira	120	2013	PA
★	São Félix do Xingu	134	2013	PA
II	Altamira	57	2012	PA
★	São Félix do Xingu	63	2012	PA
★	São Félix do Xingu	93	2013	PA
➔	Nova Canaã do norte	32	2011	MT
☞	Paraíso	70	2012	TO
★	São Félix do Xingu	62	2012	PA
☞	Novo Progresso	40	2011	PA
➔	Nova Canaã do norte	23	2011	MT
☞	Bannach	30	2011	PA
·	Marianópolis	101	2013	TO
★	São Félix do Xingu	110	2013	PA
·	Lucas do Rio Verde	114	2013	MT
·	Lucas do Rio Verde	115	2013	MT
■	Xinguara	135	2013	PA
★	São Félix do Xingu	95	2013	PA
·	Denise	117	2013	MT
·	Novo Horizonte	31	2011	RO
▲	Colíder	45	2011	MT
◇	Água Azul do Norte	107	2013	PA
×	Itupiranga	11	2010	PA
·	Porto Alegre	56	2012	RS
·	Redenção	74	2013	PA
·	Porto Alegre	50	2012	RS
·	Porto Alegre	51	2012	RS
·	Porto Alegre	52	2012	RS
·	Porto Alegre	53	2012	RS
·	Porto Alegre	54	2012	RS
·	Porto Alegre	55	2012	RS
·	Marabá	16	2010	PA
·	Colméia	49	2012	TO
◆		2	2009	ES
◆		3	2009	ES
·	Formoso do Araguaia	130	2013	TO
·	Cabixi	28	2011	RO
·	Uberaba	6	2009	MG
·	Uberaba	8	2009	MG
·	Uberaba	4	2009	MG
·	Uberaba	5	2009	MG

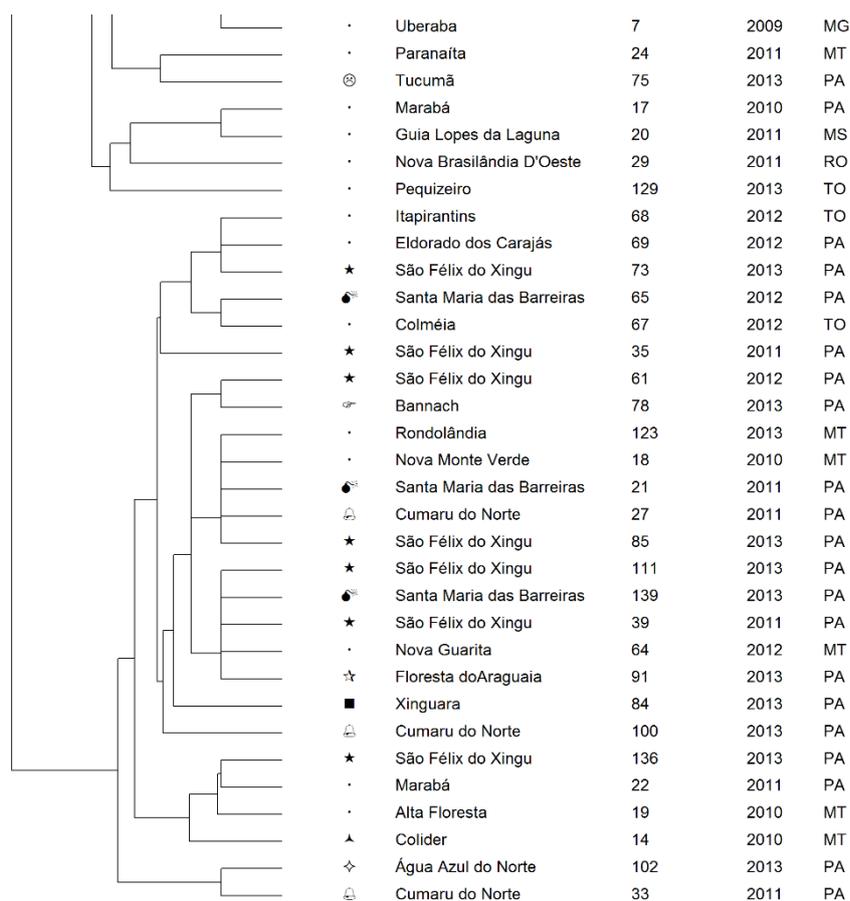


Figura 6. Dendrograma obtido a partir da análise dos genótipos das 140 amostras isoladas de *B. abortus* pelos 16 loci de VNTR do *MLVA16* acrescidos *HOOF-print3* e 4(Bruce25 e Bruce20). Nas colunas, da esquerda para direita, estão descritas: cidade, identificação da amostra, ano de isolamento e estado.

6. DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a diversidade genotípica de isolados de *B. abortus* oriundos de vários estados brasileiros, a partir da técnica *MLVA16* em associação aos *HOOF-print 3* e 4. O uso de *MLVA16* mostrou-se adequado para compreensão de relações epidemiológicas entre as amostras de *Brucella* spp. demonstrando sua potencial utilização no PNCEBT, posto que o sucesso de programas de controle e erradicação desta enfermidade estão intimamente associados a uma vigilância epidemiológica ativa e permanente.

Ao considerar os genótipos obtidos pela análise dos marcadores que compõe o *MLVA8*, observou-se que os dois grandes conglomerados de isolados de *B. abortus* formados pelos genótipos 28 e 40 (Figura 3), descritos inicialmente por Minharro et al. (2013), continuam a ser os mais frequentes no país. Ao avaliar a frequência dos perfis genotípicos obtidos nesta combinação de VNTR, observa-se que o genótipo mais frequente foi o 28, também descrito em vários países como Inglaterra, França, Costa Rica, China e Itália (Lé Fleche et al., 2006; Jiang et al. 2013; Garofolo et al. 2013). O genótipo 40, segundo mais frequente, já foi descrito em amostras

isoladas na África (Lé Fleche et al., 2006; Her et al. 2009) e anteriormente em amostras do Brasil (Minharro et al., 2013). Os genótipos 32 e 33, observados em menor frequência nesta amostragem, também foram descritos em amostras de Portugal e França (Ferreira et al., 2012; Lé Fleche et al., 2006) e no Brasil em menor frequência (Minharro et al., 2013). O genótipo 112 foi descrito apenas na Itália (Garofolo et al., 2013) e na China (Jiang et al., 2013).

Os genótipos com proximidade aos já descritos, 112A, 28A e 28B, sugerem a ocorrência de relações evolucionárias de longo prazo aos genótipos mais próximos, 112 e 28, respectivamente, já que os marcadores do *MLVA8* (Painel 1 do *MLVA16*), formados por *loci* mais conservados, não indicam informações epidemiológicas recentes. Deste modo o número relativamente pequeno de genótipos encontrados ao *MLVA8* (8 genótipos) pode ser explicado por esta combinação de marcadores ser constituída por *VNTR* muito estáveis e conservados, minisatélites, com unidades de repetição maiores que 9 pb (Le Fléche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). Vale ressaltar que os *VNTR* que compõe o *MLVA8* apresentam uma menor discriminação, com maior probabilidade de descrição de genótipos semelhantes, comparado ao *MLVA16*, composto também por marcadores de microssatélites, mais sujeitos a mutações e consequentemente, mais discriminatórios.

Uma alta diversidade genética foi observada entre os isolados brasileiros nesta amostragem, considerando o *MLVA16*, possivelmente devido a origem diversificada dos isolados. Este é o segundo trabalho de tipificação molecular de isolados de *B. abortus* de bovinos realizado no Brasil usando o *MLVA16*. No estudo anterior (Minharro et al., 2013), foi observada uma maior diversidade genotípica (89 genótipos) em 137 isolados, número de amostras semelhante a do presente estudo, no qual foram observados, em 140 isolados, 58 diferentes perfis ao *MLVA16*. Estes resultados podem ser explicados considerando que, há uma diferença temporal marcante entre os dois estudos. Enquanto no trabalho de Minharro et al. (2013) as amostras tipadas foram isoladas entre os anos de 1977 e 2008, com espaço de tempo de 31 anos, neste estudo estão descritos as amostras isoladas entre os anos de 2009 a 2013. Assim, os resultados do presente estudo mostram uma alta diversidade genética em um espaço de tempo menor, de apenas de cinco anos. Além do fator tempo, outras variáveis devem ser consideradas para classificar esta alta diversidade genética, como a representatividade heterogênea de cada estado, município e propriedades.

O HGDI, índice de diversidade que caracteriza o poder discriminatório da técnica, foi de 0,97 para o *MLVA16*, semelhante ao índice descrito por Minharro et al. (2013). Os marcadores mais discriminatórios do *MLVA16*, foram Bruce16 e Bruce30, que fazem parte do painel 2B, tais marcadores também foram muito discriminatórios no trabalho de Minharro et al. (2013), bem

como em trabalhos realizados na China (Xiao et al., 2015; Jiang et al., 2011) e no Líbano (Kattar et al., 2008).

Dos 58 genótipos revelados pelo *MLVA16*, três (D, E e J) já foram descritos anteriormente no Brasil por Minharro et al. (2013), e depositados no MLVAbank (Figura 4). A descrição de genótipos idênticos e próximos aos descritos anteriormente por Minharro et al (2013) no *MLVA16*, para *B. abortus* no Brasil, provavelmente se justifica pela permanência da infecção no país, sobretudo, por serem amostras oriundas de alguns estados comuns ao primeiro estudo. Estes achados são semelhante aos descrito na China por Jiang et al (2013), que encontraram relação entre os perfis genotípicos com trabalhos realizados anteriormente em seu país. Estes estudos confirmam a proposta de uso do *MLVA* como ferramenta epidemiológica, com possibilidade de classificar geneticamente agrupamentos de amostras isoladas e a possível proposta de monitoramento das amostras circulantes no país (O’Callaghan e Whatmore, 2011).

A estabilidade nos marcadores que compõem o *MLVA16* quando submetidos a pressão seletiva em infecções naturais (Dorneles et al., 2013) ou *in vitro* (Whatmore et al., 2006 e Dorneles et al., 2013) já foi comprovada, não induzindo mutações significativas detectáveis pela análise de múltiplos *loci* com *VNTR*. Neste estudo o genótipo D, previamente descrito nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, foi encontrado nos estados do Pará e Mato Grosso. O genótipo E foi encontrado nos Estados do Pará e Mato Grosso, anteriormente descrito apenas no Estado de Minas Gerais. O genótipo J foi encontrado em municípios ao sul do Estado do Pará e Tocantins, descrito anteriormente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina. O fato dos mesmos genótipos terem sido descritos em estados diferentes sugere que o deslocamento dos genótipos para outros estados ocorra pela dispersão da infecção a partir de trânsito animal interestadual. Vale ressaltar que a expansão da bovinocultura nos estados do Pará e Rondônia nos últimos anos (BRASIL, 2013) pode ter favorecido esta migração de animais infectados, consequentemente colaborando para a dispersão da infecção e identificação de genótipos já descritos no Brasil em estados da região Sul e Sudeste. Da mesma forma, Jiang et al. (2013) sugeriram a propagação de amostras do norte para o sul da China, a partir da tipificação molecular por *MLVA*. Como foi demonstrado por Menshawy et al. (2014), o uso de *MLVA* pode fornecer informações epidemiológicas moleculares adicionais sobre o perfil específico do isolado, o que pode dar informações mais detalhadas sobre sua origem geográfica. Novamente reforçando a importância das técnicas que utilizam análise de *VNTR* para a vigilância epidemiológica.

No entanto, a descrição de genótipos iguais ou muito próximos a perfis genotípicos já descritos podem também ser reflexo da distribuição heterogênea da origem das amostras. Neste trabalho foi utilizado uma amostragem de conveniência. O número de amostras oriundas do Pará representou 62,9% do total de amostras, onde foi encontrado maior número de genótipos com

semelhança a perfis genotípicos já descritos. Como a infecção por *B. abortus* persiste no Brasil, estes genótipos podem ter distribuição por todo o território nacional. Provavelmente, estes resultados sugerem que a homoplasia de *VNTR* se repete nas amostras circulantes no Brasil. Hipótese semelhante foi descrita no Cazaquistão onde foi considerado que estirpes que circulam persistentemente no país, causando infecções esporádicas, circulem também pela China e Turquia em razão da cultura nômade dos povos antigos, que realizavam pagamentos a partir do comércio do gado, disseminando amostras de *Brucella* spp. por todo o continente asiático (Shevtsov et al., 2015).

Em relação aos genótipos que apresentam-se muito diferentes, 66,4% (93/140) exibiram pequenas diferenças de uma unidade de repetição em *loci* do Painel 2, compartilhando a maior parte dos alelos com os genótipos já descritos no MLVAbank. Estas pequenas diferenças no Painel 2, composto de *loci* constituídos por microssatélites, consistindo marcadores mais discriminatórios, sugerem a ocorrência de microevoluções dos genótipos circulantes no país. O fato de aproximadamente 81% (113/140) dos isolados deste trabalho apresentarem genótipos com proximidade ou similaridade a genótipos descritos anteriormente sugerem estreitas relações epidemiológicas, como origem comum destes micro-organismos. Estas microevoluções podem ser demonstradas no exemplo do genótipo DI, identificado no Estado do Pará, Tocantins e Mato Grosso, considerado próximo ao genótipo J, identificado neste estudo nos Estados do Pará e Tocantins, anteriormente descrito apenas nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina (Minharro et al., 2013). Estes dois genótipos foram os mais frequentes no Estado do Pará. E a diferença exibida entre estes dois genótipos consistiu em uma unidade de repetição do *locus* Bruce19, onde o tamanho de cada unidade de repetição é de apenas três pares de bases.

Vale ressaltar que os isolados de *Brucella* spp. podem sofrer pequenas alterações em alguns *loci* no decurso de uma infecção em conformidade com as alterações do hospedeiro, ambiente ou agente, gerando estas microevoluções (Mick et al., 2014; Her et al., 2009; Al Dahouk et al. 2007). Contrário ao descrito por Whatmore et al. (2006) e Dorneles et al. (2013), que não descreveram mutações significativas detectáveis pela avaliação dos *loci* de *VNTR* *in vivo* quando os perfis foram avaliados por até 270 e 480 dias, respectivamente, ou mutações *in vitro* quando as amostras de *Brucella* spp. foram avaliadas até a passagem de número 12 e 10, respectivamente. No entanto não foram avaliadas as mutações após estes períodos.

Diferente dos demais genótipos, 18 perfis genotípicos, representados por 27 isoladas de *B. abortus*, apresentaram distâncias ou diferenças nos *loci* do Painel 1, ou mesmo apresentaram diferenças maiores que duas unidades de repetição nos *loci* do Painel 2 em relação as amostras depositadas no MLVAbank, indicando que há uma menor relação destes perfis genotípicos aos já descritos no Brasil, sugerindo então se tratar de genótipos diferentes já depositados no

MLVAbank. Pela extensão do território brasileiro e como foi realizado apenas um estudo anterior a este, pode ser que estes genótipos apenas não tivessem sido identificados anteriormente, mas já estivessem presentes nas infecções dos rebanhos bovinos nacionais. Estes resultados podem ser de grande utilidade para a vigilância epidemiológica das amostras de *Brucella* spp. que circulam no país, uma vez que a partir de informações sobre perfis genotípicos existentes no Brasil pode-se avaliar quais genótipos estão presentes em cada região. Estas informações podem auxiliar na caracterização das relações epidemiológicas, para o monitoramento das amostras e mesmo permitir que seja identificada sua origem geográfica, com possibilidade de sugerir a introdução ou reintrodução de determinado genótipo. Neste aspecto, esta ferramenta pode contribuir na fase de controle e erradicação da brucelose, sobretudo em fases avançadas do programa vigente no país.

Em contraste ao *MLVA16*, o emprego dos *HOOF-print* 3 (Bruce25) e *HOOF-print* 4 (Bruce20) em associação com *MLVA16* não forneceu informações claras de relações epidemiológicas entre os isolados do presente estudo, já que esses *loci* possuem *VNTR* com sequência em microssatélite que se mostraram altamente variáveis. Estes achados podem ser provavelmente justificados pela grande extensão do território brasileiro e amostragem diversificada, com isolados provenientes de várias cidades, além do alto poder discriminatório já relatado para estes marcadores (Bricker et al., 2003; Whatmore et al., 2006; Almendra et al., 2009). O uso destes *VNTR* de alta resolução para a tipificação molecular dos isolados é recomendado para discriminar espécies e genótipos de *Brucella* spp com distância em escala geográfica e temporal relativamente pequena, como surtos, e fornecem nestes casos informações mais precisas sobre as fontes de infecção (Almendra et al., 2009; Whatmore et al., 2006; Bricker et al., 2003). De fato, a partir da associação dos *HOOF-prints* um novo genótipo foi encontrado na Província de Shanxi e outro na Províncias de Guangdong, regiões da China que apresentavam homogeneidade entre seus genótipos quando testado apenas pelo *MLVA16* (Xiao et al., 2015). De acordo com os resultados de Xiao et al. (2015) o *MLVA16* e a associação do *MLVA16* com *HOOF-prints*, são métodos que podem ser utilizados para a vigilância epidemiológica da brucelose, atendendo a situações diferentes. Ou seja, o *MLVA16* é mais recomendado em áreas endêmicas, já para avaliação de surtos ou epidemia deve-se optar pelo uso dos *HOOF-print*.

7. CONCLUSÃO

A tipificação molecular de amostras de *B. abortus* isoladas entre 2009 e 2013 pelo *MLVA16* permite concluir que existe uma alta diversidade genética entre os isolados brasileiros, com possíveis microevoluções das amostras deste trabalho em relação as amostras brasileiras já depositadas no MLVAbank. A partir do *MLVA8* foi possível constatar que os genótipos mais frequentes no Brasil continuam sendo o genótipo 28 e 40. Os resultados deste trabalho sugerem que a associação do *MLVA16* ao *HOOF-print3* (Bruce25) e *HOOF-print4*(Bruce20) não foi adequada aos objetivos deste trabalho, por serem marcadores muito discriminatórios e desta forma apresentar discriminação máxima entre os isolados. Entretanto sua aplicação é recomendada em surtos ou na avaliação de isolados de *Brucella* spp. que apresentem distâncias geográficas e temporal pequenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N. & SZYFRES, B. ZOONOSIS Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES COMUNES AL HOMBRE Y A LOS ANIMALES. 3ª Ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 3 vols. (Publicación Científica y Técnica No. 580).

ADONE, R.; PASQUALI, P. Epidemiosurveillance of brucellosis. *Rev Sci Tech.* v. 32, p. 199–205, 2013.

AL DAHOUK, S.; LE FLECHE, P.; NOCKLER, 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.

ALMENDRA, C.; SILVA, T. S.; BEJA-PEREIRA, A.; FERREIRA, A. C.; O-BECK, L. F.; CORRÊA DE SÁ, M I.; BRICKER, B. J.; LUIKART, G. “HOOF-Print” genotyping and haplotype inference discriminates among *Brucella* spp. isolates from a small spatial scale. *Infection. Genetics and Evolution*, v. 9, p.104–107, 2009.

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

ÁLVAREZ, J.; SÁEZ, J.L.; GARCÍA, N.; SERRAT, C.; PÉREZ-SANCHO, M.; GONZÁLEZ, S.; ORTEGA, M. J.; GOU, J.; CARBAJO, L.; GARRIDO, F.; GOYACHE, J.; DOMÍNGUEZ, L. Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA SDA Nº 73, DE 02 DE SETEMBRO DE 2015. Projeto de Instrução Normativa. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 setembro. 2015. Seção 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Janeiro de 2014. (a)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano mais pecuária / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. 32 p. – Brasília : MAPA/ACS, 2014. (b)

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, v. 41, p.1-108, 2013.

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. Secao 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2006.188 p.

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

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 435–446, 2002.

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.

CARVALHO NETA, A. V.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, v. 184, p.146–155, 2010.

CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M., FERREIRA, F. et al. 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, 89p, 2006.

DELVECCHIO, V.G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R.J.; PATRA, G. et al. 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.

DE SANTIS, R.; CIAMMARUCONI, A.; FAGGIONI, G.; FILLO, S.; GENTILE, B.; DI, et al. High throughput MLVA-16 typing of *Brucella* based on the microfluidics technology. *BMC Microbiol.*, v.11, p. 60, 2011.

DORNELES, E.M.S.; PELLEGRIN, A.O.; PÉRES, I. A. H. F. S.; MATHIAS, L. A.; MOURÃO, G. et al. Serology for brucellosis in free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and brown-nosed coatis (*Nasua nasua*) from Brazilian Pantanal. *Ciência Rural*, v.44, n.12, p.2193-2196, dez, 2014a.

DORNELES, E. M. S.; SANTANA, J. A.; ALVES, T. M.; PAULETTI, R. B. ET AL. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16). *BMC Microbiology*, v. 14, p. 186, 2014b.

DORNELES, E.M.S.; FARIA, A.P.P.; PAULETTI, R. B.; SANTANA, J. A. et al. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine*, v. 31, p. 4856– 485, 2013.

Technology, 223, 683–689, 2006.

DORNELES, E.M.S. Avaliação da diversidade genética de isolados de *Brucella abortus* em um foco de brucelose. Belo Horizonte, 2011. 42 f. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

EMMERZAAL, A.; DE WIT, J.J.; DIJKSTRA, T.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F.G. The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q.* v.24, p.40-6, 2002.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Surveillance of animal brucellosis, Chapter 5. In: Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/y4723e/y4723e07.htm#TopOfPage>>. Acesso em 26 de novembro de 2015.

FERREIRA, A. C.; CHAMBEL, L.; TENREIRO, T.; CARDOSO, R.; FLOR, L.; DIAS, I. T.; PACHECO, T.; GARIN-BASTUJI, B.; LE FLECHE, P.; VERGNAUD, G.; TENREIRO, R.; CORRÊA DE SÁ, M. I. MLVA16 Typing of Portuguese Human and Animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates. *PLOS ONE*, v.7, 2012.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov., and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, v.57, p.2688–2693, 2007.

FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; SMITS, H.L. Human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* V.7, p.775–786, 2007.

GARCIA-YOLDI, D.; LE FLECHE, P.; MARIN, C. M.; DE MIGUEL, M.J.; MUNOZ, P.M.; VERGNAUD, G.; LOPEZ-GONI, 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, 2007.

GAROFALO, G.; MASSIMO ANCORA, M.; DI GIANNATALE, E. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* v. 92, p. 103–107, 2013.

- GLYNN, M.K.; LYNN, T.V. Brucellosis. *Vet Med Today: Zoonosis Update, JAVMA*, V. 233, 2008.
- GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J.*, v.51, p. 296-305, 2010.
- GODFROID, J.; KASBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary microbiology*, v.90, n.135-145, 2002.
- GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech*, v. 21, p. 277–286, 2002.
- GWIDA, M., AL DAHOUK, S., MELZER, F., ROSLER, U., NEUBAUER, H., TOMASO, H. Brucellosis – regionally emerging zoonotic disease? *Croat. Med. J.* v. 51, p. 289–295, 2010.
- 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.
- HER, M.; KANG, S.; CHO, D.; CHO, Y.; HWANG, I.; HEO, Y.; JUNG, S.; YOO, H. Application and evaluation of the MLVA typing assay for the *Brucella abortus* strains isolated in Korea. *BMC Microbiology*,v.9, p. 230-243, 2009.
- HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numeric Index of the discriminatory ability of typing systems: in application of Simpson’s Index of Diversity. *J. Cli. Microbiol.*, v. 26, n.11, p.2465-2466. 1988.
- JIANG, H.; WANG, H.; XU, L.; HU, G.; MA, J.; XIAO, P.; FAN, W.; DI, D.; TIAN, G.; FAN, M.; MI, J.; YU, R.; SONG, L.; ZHAO, H.; PIAO, D.; CUI, B. MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China. *PLOS ONE*, V. 8, 2013.
- JIANG, H.; FAN, M.; CHEN, J.; MI, J.; YU, R., et al. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1,2 and 3 isolates. *BMC Microbiol*, v.11, p. 256, 2011.
- KATTAR, M. M.; JAAFAR, R. F.; ARAJ, G. F.; LE FLÈCHE, P.; MATAR, G. M.; RACHED, R.A.; SIMON KHALIFE, S.; VERGNAUD, G. Evaluation of a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Scheme for Typing Human *Brucella* Isolates in a Region of Brucellosis Endemicity. *J. of Clin. Microbi.*, v. 46, p. 3935–3940, 2008.
- LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, n.3, p.202-212, 2008.

LÉ FLECHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOËUD, F.; NOCKLER, 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.

LOPEZ-GONI, I; GARCIA-YOLDI, D; MARIN, C. M.; DE MIGUEL, M.J. et al. 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.

MAQUART, M.; LE FLÈCHE, P.; FOSTER, G.; TRYLAND, M.; RAMISSE, F.; DJONNE, 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 Microbiology*, v.9, p.145, 2009.

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.

MATHIAS, L. A.; CORBELLINI, L. G.; MAIA, L.; NASCIMENTO, K. F.; PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L.E.; SERQUEIRA, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; DE SOUZA, M. M. A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Ciência Rural*, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MENSHAWY , A.M.; PEREZ-SANCHO, M.; GARCIA-SECO, T.; HOSEIN, H.I.; GARCÍA, N.; MARTINEZ, I.; SAYOUR, A.E.; GOYACHE, J.; AZZAM, R.A.; DOMINGUEZ, L.; ALVAREZ, J. Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *Biomed Res Int.*, V. 2014, 7 pages, 2014.

MICK, V.; LE CARROU, G.; CORDE, Y.; GAME, Y.; JAY, M.; GARIN-BASTUJI, B. *Brucella melitensis* in France: Persistence in Wildlife and Probable Spillover from Alpine Ibex to Domestic Animals. *Plos One*, v.9, 2014.

MINHARRO, S.; MOL, J.P.S.; , DORNELES, E.M.S.; PAULETTI, R.B.; NEUBAUER, H.; MELZER, F.; POESTER, F.P.; DASSO, M.G.; PINHEIRO, E.S.; FILHO, P.M.S.; SANTOS, R.L.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A.P. Biotyping and Genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* Isolated from Cattle in Brazil, 1977 to 2008. *PLOS ONE*, V. 8, 2013.

MIRANDA, K.L.; POESTER, F.P.; MINHARRO, S.; DORNELES, E.M.S. et al. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: Immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. *Vaccine*, v. 31 p. 3014–3018, 2013.

- MIRANDA, K. L.; ALVES, C.M.; MINHARRO, S.; LOBO, J.R.; MULLER, E.E.; GONCALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT. *Leite Integral*, Belo Horizonte, p. 44-55, 2008.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. Brucella evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* v. 90, p. 209-227, 2002.
- MUCHOWSKI, J.; KOYLASS, M.; GOPAUL, K.; PERRETT, L.; DALE, E. J.; WHATMORE, A. Characterisation of a novel Brucella from Litoria caerulea (White's tree frog) in the United Kingdom. Brucellosis 2014 International Research Conference, Berlim, 2014.
- NIELSEN, K.H.; EWALT, D.R., 2004. Bovine Brucellosis. Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris, FR. pp. 328–345.
- O'CALLAGHAN, D.; WHATMORE, A. M. Brucella genomics as we enter the multi-genome era. *Brief. Funct. Genomics*, v. 10, p. 334–341, 2011.
- O.I.E. World Organization for Animal Health. BOVINE BRUCELLOSIS, capítulo 2.4.3. In: *Terrestrial Manual* 2012. Disponível em : <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf>. Acessado em: 29 de julho de 2015.
- OLSEN, S. C.; BELLAIRE, S. C.; ROOP II, R. M.; THOEN, C. O. BRUCELLA. Em: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; C O THOEN, C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4ª edição, Ames, Iowa: 2010. p. 429-438.
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis.*, Ginebra: OMS, 1986. 149p. (Série de informes técnicos, 740).
- ORZIL, L.L.; PREIS, I. S.; ALMEIDA, I. G.; SOUZA, P. G.; SOARES FILHO, P. M.; JACINTO, F. B.; FONSECA JÚNIOR, A.A. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. *Ciência Rural*, 2015. Impresso.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* v. 6, p. 91–99, 2006.
- PAULSEN, I.T.; SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A. et al. 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.
- POESTER, F.; FIQUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.1-5, 2009.

- RANJBAR, R.; KARAMI, A.; FARSHAD, S.; GIAMMANCO, G. M., MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica*, v. 37, p. 1-15, 2014.
- SCHOLZ, H.C. E VERGNAUD, G. Molecular characterization of *Brucella* species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v.32, p.149-162, 2013.
- SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GOLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; NOCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 58, p. 375-382, 2008.
- SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.*, v. 140, p.392–398, 2010.
- SHEVTSOV, A.; RAMANCULOV, E.; SHEVTSOVA, E.; KAIRZHANOVA, A.; TARLYKOV, P.; FILIPENKO, M.; DYMOVA, M.; ABISHEVA, G.; JAILBEKOVA, A.; KAMALOVA, D.; CHSHERBAKOV, A.; TULEGENOV, S.; AKHMETOVA, A.; SYTNIK, I.; KARIBAEV, T.; MUKANOV, K. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16. *Infection, Genetics and Evolution*, V.34, P. 173–180, 2015.
- SIKUAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, supl. 1, p.103-108, 2009.
- 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.
- TRAUB, R.J.; MONISB, P.T.; ROBERTSONA, I.D. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v.35, p.1295–1307, 2005.
- VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol* v.49, p. 22–27, 2007.
- VAN BELKUM, A. High throughput epidemiological typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*, v.9, p. 86–100, 2003.
- 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, p. 292-295, 1985.

- 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.
- WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M.S.; BREW, S. D.; PERRETT, L.L.; KOYLASS, M.S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H.C.; DICK JR, E.J.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. Full taxonomic description of the proposed eleventh *Brucella* species, *Brucella papionis* sp. nov, isolated from baboons. Brucellosis 2014 International Research Conference, Berlin, 2014.
- 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.
- WHATMORE, A. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infectious, Genetics and Evolution*. v. 9, p. 1168–1184, 2009.
- WHATMORE, A.M.; SHANKSTER, S.J.; PERRETT, L.L. MURPHY, T.J. et al. 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.
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Chapter 2.4.3. Bovine brucellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals/ OIE Terrestrial Manual 2012. Paris: OIE; 2009. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf. Acesso em: 31 de outubro de 2015.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The development of new/improved brucellosis vaccines: Report of a WHO Meetin 11-12 december, 1997. Geneva, Switzerland.
- XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; HARTIGH, A. B.; RENÉE M.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, v. 4, p. 109-118, 2010.
- XIAO, P.; YANG, H.; DI, D.; PIAO, D.; ZHANG, Q.; HAO, R.; YAO, S.; ZHAO, R.; ZHANG, F.; TIAN, G.; ZHAO, H.; FAN, W.; CUI, B.; JIANG, H. Genotyping of Human *Brucella melitensis* Biovar 3 Isolated from Shanxi Province in China by MLVA16 and HOOF. *PLOS ONE*, V. 10, 2015.
- YU, W.L.; NIELSEN, K. Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. *Croat Med J.*, v. 51, p. 306-13, 2010.

8. ANEXOS

Tabela 6. Dados gerais: identificação da amostra, unidade de repetição em cada *locus*, genótipo pelo *MLVA16*, genótipo pelo *MLVA8*, estado de origem, ano de isolamento

Amostra	B04	B06	B07	B08	B09	B11	B12	B16	B18	B19	B21	B30	B42	B43	B45	B55	MLVA16	MLVA8	ESTADO	ANO
10	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2010
13	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	MT	2010
15	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2010
36	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2011
58	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2012
87	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
80	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
90	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
96	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
92	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
79	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	TO	2013
121	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
124	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
125	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
127	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3	DI	28	PA	2013
9	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2010
94	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	TO	2013
76	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013
105	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013
106	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013
112	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013
118	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013
119	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3	J	28	PA	2013

132	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3 J	28	PA	2013
133	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3 J	28	PA	2013
41	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	MT	2011
44	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	PA	2011
46	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	MT	2012
83	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	MT	2013
141	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	PA	2013
82	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	PA	2013
140	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	2	2	3	3 DG	28	PA	2013
57	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2012
63	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2012
93	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2013
109	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2013
116	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	MT	2013
120	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2013
134	3	4	4	5	3	4	12	4	6	44	8	5	2	2	3	3 D	28	PA	2013
97	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
99	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
103	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
104	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
137	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
138	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 DQ	28	2013	2013
50	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012
51	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012
52	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012
53	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012
54	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012

55	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EI	28	RS	2012
4	3	4	4	5	3	4	12	5	6	50	9	6	2	2	3	3 EM	28	MG	2009
5	3	4	4	5	3	4	12	5	6	50	9	6	2	2	3	3 EM	28	MG	2009
6	3	4	4	5	3	4	12	5	6	50	9	6	2	2	3	3 EM	28	MG	2009
7	3	4	4	5	3	4	12	5	6	50	9	6	2	2	3	3 EM	28	MG	2009
8	3	4	4	5	3	4	12	5	6	50	9	6	2	2	3	3 EM	28	MG	2009
60	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	6	2	2	3	3 DJ	28	PA	2012
71	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	6	2	2	3	3 DJ	28	PA	2012
89	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	6	2	2	3	3 DJ	28	PA	2013
128	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	6	2	2	3	3 DJ	28	TO	2013
59	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	6	2	2	3	3 DJ	28	PA	2012
18	5	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EX	40	MT	2010
21	5	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EX	40	PA	2011
27	5	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EX	40	PA	2011
85	5	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EX	40	PA	2013
123	5	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EX	40	MT	2013
39	4	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EY	40	PA	2011
64	4	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EY	40	MT	2012
91	4	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EY	40	PA	2013
111	4	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EY	40	PA	2013
139	4	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EY	40	PA	2013
42	4	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 E	28	PA	2011
43	4	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 E	28	MT	2011
81	4	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	5	2	2	3	3 E	28	PA	2013
25	3	4	4	5	3	4	12	7	7	46	9	6	2	2	3	3 DB	28	MT	2011
98	3	4	4	5	3	4	12	7	7	46	9	6	2	2	3	3 DB	28	PA	2013
1	3	4	4	5	3	4	12	7	7	46	9	6	2	2	3	3 DB	28	ES	2009

47	3	4	4	5	3	4	12	5	7	46	9	5	2	2	3	3 DD	28	PA	2012
48	3	4	4	5	3	4	12	5	7	46	9	5	2	2	3	3 DD	28	PA	2012
88	3	4	4	5	3	4	12	5	7	46	9	5	2	2	3	3 DD	28	PA	2013
68	6	3	4	5	3	3	12	3	8	45	8	3	2	2	3	3 ET	40	TO	2012
69	6	3	4	5	3	3	12	3	8	45	8	3	2	2	3	3 ET	40	PA	2012
73	6	3	4	5	3	3	12	3	8	45	8	3	2	2	3	3 ET	40	PA	2013
77	3	4	3	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3 DN	28	PA	2013
122	3	4	3	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3 DN	28	PA	2013
32	3	4	4	5	3	4	12	4	6	50	8	6	2	2	3	3 DS	28	MT	2011
70	3	4	4	5	3	4	12	4	6	50	8	6	2	2	3	3 DS	28	TO	2012
114	3	4	4	4	3	4	12	7	6	44	8	5	2	2	3	3 DZ	28B	MT	2013
115	3	4	4	4	3	4	12	7	6	44	8	5	2	2	3	3 DZ	28B	MT	2013
56	4	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EH	28	RS	2012
74	4	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	4	2	2	3	3 EH	28	PA	2013
16	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	7	2	2	3	3 EJ	28	PA	2010
49	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	9	7	2	2	3	3 EJ	28	TO	2012
28	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	9	6	2	2	3	3 EN	28	RO	2011
130	3	4	4	5	3	4	12	5	6	44	9	6	2	2	3	3 EN	28	TO	2013
17	3	4	5	5	3	2	12	7	6	45	8	6	2	2	3	3 EQ	112A	PA	2010
20	3	4	5	5	3	2	12	7	6	45	8	6	2	2	3	3 EQ	112A	MS	2011
65	7	3	4	5	3	3	12	3	8	45	8	3	2	2	3	3 EU	40	PA	2012
67	7	3	4	5	3	3	12	3	8	45	8	3	2	2	3	3 EU	40	TO	2012
61	6	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EW	40	PA	2012
78	6	3	4	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EW	40	PA	2013
22	5	3	4	5	3	3	12	3	6	44	8	3	2	2	3	3 FB	40	PA	2011
136	5	3	4	5	3	3	12	3	6	44	8	3	2	2	3	3 FB	40	PA	2013

33	7	3	5	5	3	3	12	3	7	45	9	3	2	2	3	3 FE	40	PA	2011
102	7	3	5	5	3	3	12	3	7	45	9	3	2	2	3	3 FE	40	PA	2013
38	3	4	5	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3 DO	28	PA	2011
113	3	4	5	5	3	4	12	5	6	45	8	5	2	2	3	3 DO	28	TO	2013
2	3	4	4	5	3	4	12	4	6	45	9	6	2	2	3	3 EK	28	ES	2009
3	3	4	4	5	3	4	12	7	6	45	9	6	2	2	3	3 EL	28	ES	2009
11	3	3	4	5	3	4	12	5	6	45	9	5	2	2	3	3 EG	33	PA	2010
14	4	3	4	5	3	3	12	3	6	44	8	3	2	2	3	3 FC	40	MT	2010
19	5	3	7	5	3	3	12	3	6	44	8	3	2	2	3	3 FD	40	MT	2010
23	3	4	4	5	3	4	12	5	6	45	8	4	2	2	3	3 DV	28	MT	2011
24	4	4	4	5	3	4	12	7	6	46	8	6	2	2	3	3 EO	28	MT	2011
26	3	4	4	5	3	4	12	6	7	46	9	6	2	2	3	3 DC	28	MT	2011
29	3	4	5	5	3	4	12	8	6	44	8	6	2	2	3	3 ER	28	RO	2011
30	3	4	4	5	3	4	12	6	6	45	8	4	2	2	3	3 DW	28	PA	2011
31	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	6	1	2	3	3 ED	32	RO	2011
34	3	4	4	5	3	4	11	7	7	45	8	6	2	2	3	3 DA	28C	PA	2011
35	5	3	4	5	3	3	12	3	8	45	9	3	2	2	3	3 EV	40	PA	2011
37	3	4	4	5	3	4	12	6	6	45	8	5	2	2	3	3 DE	28	PA	2011
40	3	4	4	5	3	4	12	4	6	45	8	8	2	2	3	3 DU	28	PA	2011
45	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	5	1	2	3	3 EE	32	MT	2011
62	3	4	4	5	3	4	12	4	6	45	8	6	2	2	3	3 DT	28	PA	2012
66	3	4	5	5	3	4	12	4	6	45	8	5	2	2	3	3 DM	28	PA	2012
72	3	4	4	5	3	4	12	8	6	45	8	5	2	2	3	3 DF	28	PA	2012
75	4	4	4	5	3	4	12	8	6	46	8	5	2	2	3	3 EP	28	PA	2013
95	3	4	4	5	3	4	12	7	6	44	8	6	2	2	3	3 EB	28	PA	2013
84	5	3	2	5	3	3	12	3	7	45	8	3	2	2	3	3 EZ	40	PA	2013
86	3	4	4	5	3	4	12	5	6	46	8	6	2	2	3	3 DK	28	RO	2013
100	6	3	4	5	3	3	12	3	7	45	10	3	2	2	3	3 FA	40	PA	2013

101	3	4	4	5	3	4	12	4	6	46	8	4	2	2	3	3 DX	28	TO	2013
107	3	4	4	5	3	4	12	5	6	43	9	5	2	2	3	3 EF	28	PA	2013
110	3	4	4	5	3	4	12	4	6	45	8	4	2	2	3	3 DY	28	PA	2013
117	3	4	4	5	3	4	12	6	6	44	8	7	2	2	3	3 EC	28	MT	2013
126	4	4	4	5	3	4	12	5	7	45	8	6	2	2	3	3 CZ	28	PA	2013
129	3	4	5	5	3	3	12	5	6	44	8	5	2	2	3	3 ES	112	TO	2013
135	3	4	4	5	3	4	12	7	6	44	8	5	2	2	3	3 EA	28	PA	2013
