

**VANESSA RIESZ SALGADO**

**Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs)  
para o diagnóstico diferencial das principais espécies de *Brucella***

**São Paulo**

**2011**

**VANESSA RIESZ SALGADO**

**Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs)  
para o diagnóstico diferencial das principais espécies de *Brucella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2406  
FMVZ

Salgado, Vanessa Riesz

Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs) para o diagnóstico diferencial das principais espécies de *Brucella* / Vanessa Riesz Salgado. -- 2011.

123 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.  
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. *Brucella*. 2. Espécies. 3. Padronização. 4. PCRs. 5. Diagnóstico diferencial.  
I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenho de *primers* espécie-específicos e padronização de diferentes reações em cadeia pela polimerase (PCRs) para o diagnóstico das principais espécies do gênero *Brucella*", protocolado sob o nº1269/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Design of specie-specific primers and standardization of different polymerase chain reactions (PCRs) to diagnosis the main species of *Brucella* genus", protocol number 1269/2007, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Prof. Dra Denise Tabacchi Fantoni  
Vice-Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP  
SP, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SALGADO. Vanessa Riesz

**Título: Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs) para o diagnóstico diferencial das principais espécies do gênero *Brucella***

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Paulo Regis Salgado e Marisa Riesz Salgado,  
avós paternos Eunice Salgado e Maximiliano Lessa Salgado (in memoriam),  
e avós maternos Hilda Riesz e Fernandes Riesz (in memoriam),  
como forma de agradecimento e reconhecimento  
por tudo que vocês fazem ou fizeram e por mim!*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar aqui minha sincera gratidão a todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram e colaboraram de alguma maneira para que este trabalho pudesse ser realizado...

**À Deus, pela vida maravilhosa e as oportunidades que me oferece todos os dias.**

Aos meus pais, **Paulo Regis Salgado e Marisa Riesz Salgado**, que estão sempre ao meu lado, obrigada pelo exemplo de vida, amor e carinho, pela confiança e apoio todos os dias.

Às minhas avós, **Eunice Salgado e Hilda Riesz**, e ao meu irmão, **Alexandre Riesz Salgado**, obrigada pelo amor e de carinho, pelo apoio e pela convivência prazerosa todos estes anos.

Ao meu noivo, **Artur Trancoso Lopo de Queiróz**, obrigado pelo amor incondicional, companheirismo, paciência, conselhos e idéias inovadoras de bioinformática que foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos meus cachorros, **Mamãe e Téo**, obrigada pela convivência harmoniosa e pelas palavras silenciosas (latidos, lambidas e abanadas de rabo) de apoio e consolo.

Ao meu orientador Professor Dr. **Leonardo José Richtzenhain**, meus agradecimentos pela orientação, confiança em todos os momentos, pelos conselhos profissionais e oportunidade de realizar mais uma etapa de minha carreira.

À grande amiga e Professora Dra. **Lara Borges Keid**, que vem me acompanhando e ajudando desde o mestrado, que me ensinou muitas coisas sobre isolamento e PCR de *Brucella*, que me auxiliou a conseguir um orientador e a ingressar no doutorado, que me sugeriu a realização deste trabalho e ajudou a solucionar muitas dificuldades durante seu desenvolvimento, serei eternamente grata a você, por toda ajuda, seus ensinamentos, sua amizade e companheirismo.

Ao amigo e Professor Dr. **Rodrigo Martins Soares**, que também me ajudou a conseguir orientação para o doutorado, incentivou e ajudou em muitas etapas do desenvolvimento deste trabalho, meu agradecimento pelo direcionamento, por seus ensinamentos, pelos conselhos profissionais, pela ajuda e amizade.

Ao amigo e Professor Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, obrigada por todo auxílio e colaboração durante a realização prática deste trabalho, pelos direcionamentos, por seus ensinamentos e exemplo, pelos conselhos profissionais e amizade.

À Dra. **Eliana Scarcelli Pinheiro**, do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, do Instituto Biológico, meus sinceros agradecimentos pelos isolados de *B. abortus* cedidos, eles foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microrganismos de Referência, do Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); do Rio de Janeiro, na pessoa do Sr. **Ivano de Filippis**, meus sinceros agradecimentos pela cepa de referência de *B. canis* (ATCC 233365) cedida, ela também foi imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Sergio Russo Matioli**, do Instituto de Biociências, USP, por tão gentilmente ter me aberto às portas do seu laboratório para que eu pudesse processar algumas PCRs deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. **Andrey Pereira Lage** e a **Telma Maria Alves**, da Escola de Veterinária da UFMG, meus sinceros agradecimentos, pela solicitude em arrumar os DNAs de *B. abortus*, cujos resultados ainda não foram adicionados a este trabalho, e realizar o exame com a metodologia Bruce-ladder em um dos isolados deste trabalho.

À grande amiga **Sibele Pinheiro de Souza**, que me ajudou em todos os momentos, obrigada por ficar ao meu lado, por me escutar pacientemente e sempre dar seu apoio “colorido”, não tenho palavras para agradecer toda força e os bons momentos que compartilhamos nestes anos de convivência.

Ao prezado colega **André Yoshiaki Kashiwabara**, do Programa de Interunidades em Bioinformática, meu sincero obrigada pelo auxílio durante o alinhamento dos cromossomos de *Brucella*, e minhas desculpas por monopolizar seu servidor durante alguns dias e quase prejudicar os processamentos que estavam em execução.

À técnica **Sheila Oliveira de Souza Silva**, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, meus sinceros agradecimentos pela convivência pacífica, ajuda na rotina laboratorial, amizade, conversas, pelo apoio e companheirismo.

Às técnicas **Zenaide M. Moraes Higa** e **Gisele Oliveira de Souza**, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, que gentilmente me acolheram no laboratório e me ajudaram, arrumando materiais e lugares na estufa para eu processar as



culturas, ajudando a preparar os meios de cultura e na lavagem do material, muito obrigada pela ajuda, pelas conversas e pela convivência pacífica.

Às minhas queridas amigas **Thaís Lucas Sandri** e **Estela Gallucci Lopes**, agradeço pelo apoio e carinho, por toda torcida e pelos muitos bons momentos que compartilhamos nestes anos.

À minha querida amiga **Bianca Rocha Santos**, meus agradecimentos sinceros pelos conselhos pessoais e profissionais, pelo incentivo, apoio, ajuda e carinho, e pelos bons momentos que compartilhamos.

Às queridas amigas **Acácia Orieth Elias**, **Juliana Giantomassi Machado**, **Nair Cavalcanti de Lira** e **Danielle Bastos Araújo**, que mesmo de longe, fizeram parte desta trajetória, com carinho especial agradeço o companheirismo, a amizade, a torcida, o apoio e incentivo.

Aos meus amigos e amigas do laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, **Willian Fahl**, **Karen Miyuki Asano**, **Alessandra M. M. G. de Castro**, **Iracema Barros**, **Carolina Torres Alejo**, **Karen Linares Ferrari**, **Juliana Nogueira**, **Haila Chagas**, **Cíntia Favero**, **Enio Mori**, **Rafael Novaes**, **Camila Oliveira**, **Giselle Ayres**, **Camila Souza Torelli**, **Sueli Santos**, **Michelle Klein Sercundes**, **Juliana Martins**, **Marcio Pinotti Guirão**, **Elizabeth Cristina Mota Marconi**, **Cíntia Manzatto Baldin**, **Andrea Isabel Esteves Garcia**, **Aline Hora**, **Aryana Lima**, e todos os outros que me apoiaram nessa trajetória, serei eternamente grata ao companheirismo e amizade, à convivência harmoniosa, à torcida e colaboração, aos momentos de descontração e às demonstrações de amizade.

Às amigas do Laboratório de Zoonoses e Higiene Alimentar, **Vivianne Cambuí Mesquita Rocha**, **Marianna Matrone**, **Pilar Vejarano Ruibal**, **Amane Paldês Gonçalves**, **Flávia Morato**, **Cassia Ikuta**, **Alessandra Maldonado**, **Camila Diniz Fontanesi**, **Carolina Américo** e todos os outros que me apoiaram nessa trajetória, sempre serei grata à ajuda direta ou indireta na realização desse trabalho, à convivência harmoniosa, à torcida, as palavras de carinho nos momentos difíceis, e aos momentos de descontração.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Parasitologia, **Iara Silveira**, **Guacyara Tenório Cavalcante**, **Fernanda Aparecida Nieri Bastos**, **Anaiá da Paixão Sevá**, **Renata Molina**, **Maurício Horta**, **Daniel Moura de Aguiar**, **Mariana Granziera Spolidorio**, **Thiago Fernandes Martins**, **Sérgio Netto Vitaliano**, **Hebert Souza Soares**, **Jonas Moraes Filho**, **Maria Halina Ogrzewalska**, **Aliny Pontes Almeida**, **João Fábio Soares**, e todos os outros que me apoiaram nessa trajetória, obrigada pela convivência diária, à torcida e palavras de carinho nos momentos difíceis, os momentos de descontração e às demonstrações de amizade.

Ao **Prof. Nilson Roberto Benites** e as amigas do Laboratório de Bacteriologia e Micologia, **Priscilla Anne Melville, Adriana Pinheiro da Franca, Tatiana Reis, Leslie Almeida** e todos os outros que me apoiaram nessa trajetória, obrigada pelos meios de cultura e materiais cedidos, as idéias e sugestões oferecidas, pela convivência diária e à torcida para que tudo desse certo.

Aos amigos da Bioinformática, **Vinícius Ramos Henriques Maracajá Coutinho, Luiz Thiberio Rangel, Alexandre Rossi Paschoal e André Yoshiaki Kashiwabara**, obrigado pelos momentos de descontração e demonstrações de amizade.

Aos queridos estagiários, **Gustavo Heidy Yamashita e Elisa Fabiana Nishimura Abreu**, obrigada pela oportunidade de ter a ajuda de vocês em meu trabalho com os géis, PCRs, extrações e na rotina laboratorial, por me darem a oportunidade de ensinar-lhes algo novo, pelos momentos de descontração e às palavras de incentivo.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, **Andrea Micke Moreno, Evelise Oliveira Telles, Fábio Gregori, Fernando Ferreira, Fumio Honma Ito, José Antonio Jerez, José Soares Ferreira Neto, Leonardo José Richtzenhain, Marcelo Bahia Labruna, Marcos Amaku, Nilson Roberti Benites, Paulo Eduardo Brandão, Ricardo Augusto Dias, Rodrigo Martins Soares, Silvio Arruda Vasconcellos, Simone de Carvalho Balian, Solange Maria Gennari e Sonia Regina Pinheiro**, agradeço por todos os ensinamentos, atenção nos momentos de dúvidas, pela confiança prestada, momentos de descontração e convivência prazerosa.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, **Danival Lopes Moreira, Tania Delonero, Sandra Abelardo Sanches, Alexandre Abelardo Sanches, Jucelia de Jesus Pereira, Pedro C. Ferreira da Silva, Renato Caravieri, Ana Virgínia P. Almeida Prado, Maria Cristina Paick, Orlando Bispo de Souza e Hilda Fátima de Jesus Pena**, que ajudaram em muitos momentos, obrigada por serem sempre tão atenciosos e prestativos, por toda ajuda dada, pelas palavras de incentivo, os momentos de descontração e a convivência prazerosa.

À seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, nas pessoas das funcionárias **Claudia Lima e Marli Costa Ribeiro**, por serem sempre atenciosas e prestativas.

Às funcionárias da Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, em especial a **Elza Faquim**, obrigada pelas correções das referências e confecção da ficha catográfica.

**À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (“FAPESP”),**  
meus sinceros agradecimentos pela confiança e apoio financeiro fornecido para a  
realização desse trabalho (Processo n<sup>o</sup>.07/56316-5).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> BcanS 307_328 e BcanAS 528_546 frente a deleção estudada de <i>B. canis</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	51
Figura 2 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> BovS 126_149 e BovAS 571_593 frente a deleção estudada de <i>B. ovis</i> e do tamanho do amplificador esperado.....	53
Figura 3 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> BabS 1484_1502 e BabAS 1893_1874 frente a deleção estudada de <i>B. abortus</i> e do tamanho do amplificador esperado.....	55
Figura 4 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> BabS ,BabAS e BabI frente a deleção estudada de <i>B. abortus</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	56
Figura 5 –	Desenho esquemático da localização dos pares <i>primers</i> BMEI 1434F/BMEI 1436R, BMEI 1436F/BMEI 1435R e BcanS/BcanAS frente a deleção estudada da <i>B. canis</i> .....	57
Figura 6 –	Desenho esquemático de <i>primers</i> dirigido a uma sequência polimórfica única da espécie, gerando apenas um <i>amplicon</i> do tamanho esperado para espécie em análise (A), e de <i>primer</i> ancorado na sequência comum de todas as espécies que flanqueia a região polimórfica, o qual geraria dois <i>amplicons</i> de tamanhos diferentes, que diferenciam a espécie em análise das demais pelo tamanho do fragmento gerado (B).....	60
Figura 7 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bcan <sub>CapDF</sub> e Bcan <sub>CapDR</sub> frente a deleção estudada de <i>B. canis</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	61
Figura 8 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bcan <sub>AcetF</sub> e Bcan <sub>AcetR</sub> frente a deleção estudada de <i>B. canis</i> e do tamanho do amplificador esperado.....	61
Figura 9 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bmel <sub>Omp31F</sub> e Bmel <sub>Omp31R</sub> frente a deleção estudada de <i>B. melitensis</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	62
Figura 10 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bmel <sub>CoAF</sub> e Bmel <sub>CoAR</sub> frente a deleção estudada de <i>B. melitensis</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	63
Figura 11 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bov <sub>OmpF</sub> e Bov <sub>OmpR</sub> frente a mutação estudada de <i>B. ovis</i> e do tamanho do amplificador esperado.....	63
Figura 12 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bov <sub>TABCF</sub> e Bov <sub>TABCR</sub> frente a deleção estudada de <i>B. ovis</i> e dos tamanhos dos amplificadores esperados.....	64
Figura 13 –	Desenho esquemático da localização dos <i>primers</i> Bcasu <sub>β-lacF</sub> e Bcasu <sub>β-lacR</sub> frente a inserção estudada de <i>B. canis</i> e <i>B. suis</i> e do tamanho do amplificador esperado nestas espécies.....	65
Figura 14 –	Padrões de amplificação randômica obtidos dos diferentes biovares e espécies de <i>Brucella</i> utilizando-se o <i>primer</i> APO7F	71

Figura 15 – Padrões de amplificação randômica obtidos de 17 cepas de <i>Brucella canis</i> isoladas de campo oriundas de diferentes canis, utilizando-se o <i>primer</i> APO7F.....	72
Figura 16 – Padrões de amplificação randômica obtidos das espécies de referência de <i>Brucella</i> e de três cepas de <i>Brucella canis</i> isoladas de campo e oriundas de diferentes canis por RAPD utilizando-se o <i>primer</i> OPLO <sub>4</sub> .....	73
Figura 17 – Padrões de amplificação randômica obtidos por RAPD utilizando-se o <i>primer</i> P <sub>4</sub> e DNA das espécies de referência de <i>Brucella</i> e de três cepas de <i>Brucella canis</i> isoladas de campo e oriundas de canis diferentes.....	75
Figura 18 – Padrões de amplificação randômica obtidos das espécies de referência de <i>Brucella</i> e de três cepas de <i>Brucella canis</i> isoladas de campo e oriundas de canis diferentes por RAPD utilizando-se o <i>primer</i> P5.....	76
Figura 19 – Colônias transformadas (colônias brancas) e não transformadas (colônias azuis) de <i>Escherichia coli</i> TOP10 cultivadas em meio LB contendo 50 µg/mL adicionado de IPTG e X-Gal para seleção das colônias transformantes.....	77
Figura 20 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de 410pb para os oito biovars das cepas de referência de <i>B. abortus</i> e do fragmento de 856-7pb das cepas de referência das demais espécies <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. ovis</i> e <i>B. neotomae</i> , quando utilizados em conjunto os <i>primers</i> BabS, BabI e BabAS.....	80
Figura 21 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados de 468pb, das amostras de <i>B. melitensis</i> bvs. 63/9 e Ether, <i>B. abortus</i> bv. C68 e <i>B. suis</i> bv 1330, com os <i>primers</i> BovS e BovAS, cujo único fragmento esperado era de 468pb das <i>B. ovis</i> .....	81
Figura 22 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados de 240pb, das amostras de <i>B. abortus</i> de campo, com os <i>primers</i> BcanS e BcanAS, cujos únicos fragmentos esperados eram os maiores do que 1000pb.....	82
Figura 23 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados maiores do que 1000pb, das amostras de <i>B. canis</i> de campo, com os <i>primers</i> BcanS e BcanAS, cujos únicos fragmentos esperados eram os de 240pb.....	83
Figura 24 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 596pb da cepa de <i>B. canis</i> e 954pb das demais espécies, com <i>primer</i> Bcan <sub>CapD</sub> desenhado para diferenciação de <i>B. canis</i> .....	87
Figura 25 – Gel de agarose dos resultados da PCR demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 596pb para quase todas os isolados de campo de <i>B. canis</i> , com <i>primer</i> Bcan <sub>CapD</sub> desenhado para diferenciação de <i>B. canis</i> .....	87
Figura 26 – Géis de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> com <i>primer</i> Bcan <sub>Acet</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. canis</i> , demonstrando a amplificação do	

	fragmento esperado de 318pb da cepa de referência de <i>B. canis</i> e uma amplificação inesperada da cepa de <i>B. suis</i> bv. 4.....	89
Figura 27 –	Gel de agarose dos resultados da PCR dos isolados de campo de <i>B. canis</i> com <i>primer</i> Bcan <sub>Acet</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. canis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 318pb para quase todas as amostras..	90
Figura 28 –	Gel de agarose dos resultados da PCR de amostras de referência de <i>B. canis</i> e <i>B. suis</i> e de isolados de <i>B. suis</i> com <i>primer</i> Bcasu <sub>β_lac</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. canis/B. suis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 572pb para quase todas as amostras.....	92
Figura 29 –	Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> com <i>primer</i> Bmel <sub>Omp</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. melitensis</i> , demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 600pb dos três biovares da cepa de referência de <i>B. melitensis</i> e 832pb das demais espécies e biovares.....	93
Figura 30 –	Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de <i>B. canis</i> com <i>primer</i> Bmel <sub>Omp</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. melitensis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 832pb para todas as amostras testadas.....	94
Figura 31 –	Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> com <i>primer</i> Bmel <sub>coA</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. melitensis</i> , demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 714-5pb dos três biovares da cepa de referência de <i>B. melitensis</i> , 821pb para <i>B. canis</i> e 825pb para <i>B. ovis</i> , <i>B. suis</i> e <i>B. abortus</i> .....	95
Figura 32 –	Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de <i>B. abortus</i> com <i>primer</i> Bmel <sub>coA</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. melitensis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 825pb para todas as amostras testadas.....	96
Figura 33 –	Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> com <i>primer</i> Bov <sub>Omp</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. ovis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 583pb para <i>B. ovis</i> .....	97
Figura 34 –	Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de <i>B. abortus</i> com <i>primer</i> Bov <sub>Omp</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. ovis</i> , demonstrando a ausência de amplificação do fragmento de 583pb esperado apenas para as amostras de <i>B. ovis</i> .....	98
Figura 35 –	Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de <i>Brucella</i> com <i>primer</i> Bov <sub>TABC</sub> , desenhado para diferenciação de <i>B. ovis</i> , demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 631pb para <i>B. ovis</i> e 895pb para <i>B. canis</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. abortus</i> e <i>B. neotomae</i> .....	99

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Regiões ou loci gênicos de <i>Brucella</i> spp., para os quais já foi relatada a existência de polimorfismos no DNA e que pode ser testado para diferenciação molecular das espécies.....	34
Quadro 2 – Amostras de referência de <i>Brucella</i> , identificadas por espécie, biovar e estirpe, utilizadas na determinação da especificidade analítica das PCRs padronizadas.....	38
Quadro 3 – Características bioquímicas e morfológicas diferenciais das espécies do Gênero <i>Brucella</i> e seus biovars, adaptado de Alton et al. (1976).....	40
Quadro 4 – Sequências de referência do cromossomo I e II de <i>Brucella</i> disponíveis no GenBank até setembro de 2009 e que foram utilizadas no alinhamento múltiplo, e seu respectivo número de acesso no GenBank.....	58
Quadro 5 – Resultados dos testes com os <i>primers</i> BMEI <sub>1434F</sub> /BMEI <sub>1436R</sub> , BMEI <sub>1436F</sub> /BMEI <sub>1435R</sub> e BcanS/BcanAS, frente às 18 cepas de referência de <i>Brucella</i> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
%	Porcento
>	maior do que
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
IS	<i>Insert Sequence</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
GI	<i>Genomic Island</i>
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction</i>
°C	graus Celsius
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
mL	mililitro
L	litro
g	múltiplos da aceleração da gravidade
µL	microlitro
M	Molar
mM	milimolar
mmol	micromol
nm	nanômetros
pmol	picomol
ng	nanograma
µg	micrograma
q.s.p.	quantidade suficiente para
pb	pares de base
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Kb	kilobase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
RAM	<i>Random Access Memory</i>
GB	gigabyte
V	volt
cm	centímetro



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	32
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.1 Amostras .....	37
5.2 Manutenção das Cepas Bacterianas .....	38
5.3 Cultivo e identificação das amostras de <i>Brucella</i> spp. ....	39
5.4 Extração de DNA das amostras de <i>Brucella</i> pelo Método da Proteinase K (PK) ..	41
5.5 Quantificação do DNA Extraído .....	42
5.6 Amplificação das amostras de <i>Brucella</i> spp. com os primers gênero-específicos ITS <sub>66</sub> e ITS <sub>279</sub> .....	42
5.7 Busca de marcadores moleculares espécie-específicos baseados em amplificação randômica .....	43
5.7.1 Primers .....	43
5.7.2 Amostras .....	44
5.7.3 Condições de Amplificação .....	44
5.7.4 Visualização dos Produtos Amplificados .....	45
5.7.5 Purificação dos produtos amplificados randomicamente .....	45
5.7.6 Clonagem dos produtos amplificados randomicamente .....	45
5.7.7 Extração de DNA plasmidial .....	46
5.7.8 PCR para obtenção de material para o sequenciamento a partir do plasmídeo .....	47
5.7.9 Sequenciamento .....	47
5.7.9.1 Purificação dos produtos amplificados por T <sub>3</sub> e T <sub>7</sub> ou M <sub>13F</sub> e M <sub>13R</sub> .....	48
5.7.9.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados .....	48
5.7.9.3 Reação de Sequenciamento .....	48
5.7.9.4 Precipitação do DNA .....	49
5.7.9.5 Edição de seqüências .....	49
5.8 Busca de marcadores moleculares espécie-específicos baseados em polimorfismos de seqüências de DNA .....	50
5.8.1 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de <i>B. canis</i> (BcanS 307_328 e BcanAS 528_546) .....	50
5.8.2 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de <i>B. ovis</i> (BovS 126_149 e BovAS 571_593) .....	52
5.8.3 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de <i>B. abortus</i> (BabS 1484_1502 e BabAS 1893_1874) .....	53
5.8.4 Desenho de novo primer espécie-específico para diagnóstico de <i>B. abortus</i> (BabI) ..	55
5.8.5 Teste de especificidade dos primers BMEI <sub>1434F</sub> /BMEI <sub>1436R</sub> e BMEI <sup>1436F</sup> /BMEI <sub>1435R</sub> descritos na literatura para diferenciação de <i>B. canis</i> .....	56
5.9 Alinhamento múltiplo das seqüências do cromossomo I e II de <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. ovis</i> e <i>B. canis</i> .....	57
5.10 Determinação da temperatura de anelamento (Ta°C) e condições de amplificação ótimas para os diferentes pares de primers desenhados .....	65
5.11 Determinação da especificidade analítica das PCRs utilizando os primers desenhados .....	66
5.12 Análise dos produtos amplificados nas PCRs .....	66

5.13 Sequenciamento .....	67
5.13.1 Purificação dos produtos amplificados .....	67
5.13.2 Reação de Sequenciamento .....	67
5.13.3 Precipitação do DNA .....	68
5.13.4 Edição de sequências .....	68
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

## RESUMO

Salgado, V. R. **Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs) para o diagnóstico diferencial das principais espécies do gênero *Brucella*.** [Development of Polymerase Chain Reactions (PCRs) for differential diagnosis of the main species of the genus *Brucella*.]. 2011. 123f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A brucelose é uma doença altamente contagiosa, responsável por grandes prejuízos econômicos e de saúde pública. É causada por bactérias do gênero *Brucella*, cujas espécies e seus biovars costumam ser caracterizados pelo isolamento e identificação de características fenotípicas da colônia. Dificuldades como, o perigo na manipulação dos microrganismos, processos laboriosos de tipificação, demora na obtenção de resultados e a instabilidade de características fenotípicas ou isolamento de linhagens atípicas dificultam a tipificação e encorajaram a busca de técnicas mais sensíveis e específicas, como a PCR, que resolveria as dificuldades e facilitaria a investigação epidemiológica dos casos humanos e animais. Diversas análises e o sequenciamento de determinados genes e do genoma completo de algumas espécies, demonstraram a existência de polimorfismos únicos no DNA das brucelas, que podem ser utilizados na sua identificação. Baseado nas dificuldades de identificação e na descoberta de polimorfismos únicos no DNA bacteriano das espécies, nosso objetivo foi desenvolver *primers* específicos para identificação de seis espécies do gênero *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, e padronizar PCRs que permitissem identificá-las com maior sensibilidade e rapidez. Tentamos caracterizar marcadores moleculares para o desenho de *primers* espécie-específicos, através da amplificação randômica e clonagem dos fragmentos específicos, sem resultados satisfatórios. Apenas um *primer* para *B. abortus* foi conseguido quando foram analisados os polimorfismos já descritos na literatura. Assim, realizou-se o alinhamento múltiplo das sequências dos cromossomos I e II das espécies de *Brucella*, que permitiu a identificação de vários eventos polimórficos específicos para cada espécie, dos quais foram escolhidas regiões potenciais para o desenho de sete *primers* (dois para *B. canis*, *B. melitensis* e *B. ovis*, e outro para *B. canis/B. suis*) que tiveram sua especificidade analítica verificada com o programa *Primer BLAST* e testada nas 18 cepas de referência de *Brucella*, compreendendo a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e seus biovars, além da *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, e em 231 isolados de campo, incluindo *B. abortus*, *B. canis* e *B. suis*. Os testes de especificidade dos *primers* resultaram na amplificação do fragmento esperado de quase todas as cepas de referência e de campo, exceto para o *primer* de *B. canis* e o de *B. canis/B. suis*. Estes resultados

sugerem que os marcadores desenhados são promissores na diferenciação das espécies.

Palavras Chave: *Brucella*, espécies, padronização, PCRs, diagnóstico diferencial.

## ABSTRACT

Salgado, V. R. **Development of Polymerase Chain Reactions (PCRs) for differential diagnosis of the main species of the genus *Brucella*.** [Desenvolvimento de Reações em Cadeia pela Polimerase (PCRs) para o diagnóstico diferencial das principais espécies do gênero *Brucella*.]. 2011. 123f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Brucellosis is responsible for great economic losses and serious impact on public health. This infectious disease is caused by bacteria of the genus *Brucella*, whose species and their respective biovars are often characterized by isolation and identification of differences in phenotypic tests. The complex and laborious process of *Brucella* typing, comprising the danger in handling of microorganisms, delay in obtaining results and instability of phenotypic characteristics or isolation of atypical strains, stimulated the search for more sensitive and specific techniques such as PCR. This technique would facilitate the epidemiological investigation of human and animal cases. Several analyses even as sequencing of certain genes and the complete genome of some species, demonstrated the existence of polymorphisms in the DNA of *Brucella*, which can be used to identify them. Due to typing difficulties and discovery of single polymorphisms in DNA bacterial species, our goals were to develop specific primers for identification of six species of the genus *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* and *B. neotomae* and standardize PCRs to identify them with greater sensitivity and speed. We tried to characterize species-specific molecular markers using random amplification and cloning of specific fragments to design primers, without satisfactory results. Only one primer based on polymorphisms already described in the literature was successful for *B. abortus* specie differentiation. Thus, we performed the multiple alignment of the complete sequences of chromosomes I and II of *Brucella* species. This approach allowed the identification of several specie-specific polymorphic events, from which potential regions were chosen for the design of seven primers (two for *B. canis*, *B. melitensis* and *B. ovis*, and one for *B. canis* / *B. suis*). The analytical specificity of all primers was verified with the Primer BLAST software. Tests with specific primers were performed on 18 reference strains of *Brucella*, including all the six species of the genus *Brucella* and 231 field strains of *B. abortus*, *B. canis* and *B. suis*. The PCRs showed the expected fragment amplification in almost all reference and field strains, except for the *B. canis* and the *B. canis* / *B. suis* primers. Ours results suggest that these PCRs are able for *Brucella* species differentiation.

Keywords: *Brucella*, species, standardization, PCR, differential diagnosis

# 1. INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa de grande impacto econômico e importância na saúde pública e animal, visto que afeta diversas espécies animais e pode ser transmitida também aos seres humanos. Acredita-se que seja uma das zoonoses mais importantes em todo o mundo, afetando cerca de 500 mil pessoas ao ano e provavelmente um número ainda maior de animais (LÓPEZ-GÕNI; MORIYÓN, 2004).

De acordo com os registros da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United States*), em torno de 97% (720 milhões) de caprinos, 70% (730 milhões) de ovinos, 80% (1.100 milhões) de bovinos e 77% (726 milhões) de suínos estão em países subdesenvolvidos, onde os serviços de saúde animal e humana geralmente são ineficientes, e animais infectados podem ser utilizados para produção de carne, leite, lã, couros, dentre outros. Este fato ainda é agravado devido à brucelose ainda estar em ascensão, em regiões como a Europa Oriental, América Latina, Ásia, partes da África, Mediterrâneo e países do Oriente Médio e à erradicação da doença ter sido alcançada por poucos países desenvolvidos (LÓPEZ-GÕNI; MORIYÓN, 2004; RYAN; GLARUM, 2008).

A doença é causada por bactérias do gênero *Brucella*, cujas principais espécies são *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* (VIZCAÍNO et al., 2000). Duas outras espécies *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, foram descritas acometendo mamíferos marinhos (CLAVAREAU et al., 1998), e mais recentemente, foram isoladas a *B. microti* de ratos silvestres com doença sistêmica na República Checa e raposas vermelhas na Áustria (HUBÁLEK et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008), e a *B. inopinata* isolada de uma infecção de implante de mama de uma paciente com sinais clínicos de brucelose (SCHOLZ et al., 2010).

Cada espécie de *Brucella* pode infectar diferentes espécies animais, mas elas mostram preferência por um determinado hospedeiro para infecção. Assim, *B. melitensis* é a principal responsável pela brucelose ovina e caprina; *B. abortus* infecta principalmente, bovinos; *B. suis* causa a brucelose em suínos, lebres e renas. *B. canis* é responsável pela brucelose canina. *B. ovis* e *B. neotomae*, causam respectivamente, epididimite em carneiros e doença em ratos silvestres do deserto e

são as únicas espécies não caracterizadas como zoonóticas (VIZCAÍNO et al., 2000).

As espécies de *Brucella* e seus biovars costumam ser diferenciados por análise de características fenotípicas de cultivo, incluindo tipificação sorológica para os antígenos A, M e R, fagotipagem, sensibilidade a corantes, requerimento de concentrações elevadas CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S e outros processos metabólicos (ALTON et al., 1976; CLOECKAERT; VIZCAÍNO, 2004). Entretanto, além de laboriosa, vários problemas estão associados à identificação das espécies por este método, como a necessidade de utilização de equipamentos de proteção, visando biossegurança na manipulação dos microrganismos; demora na obtenção dos resultados; instabilidade de algumas características e o isolamento de linhagens atípicas com características fenotípicas não condizentes às normalmente descritas (BRICKER, 2004).

Na tentativa de solucionar as dificuldades associadas à identificação das espécies e biovars, diversas técnicas moleculares foram realizadas, no sentido de identificar polimorfismos no DNA que permitissem a tipificação molecular dos membros do gênero, gerando muitos avanços no diagnóstico e na identificação das espécies e biovars de *Brucella* (GARCÍA-YOLDI et al., 2005; OCAMPO-SOSA et al., 2005).

Estudos de hibridação DNA-DNA revelaram alto grau de similaridade (>90%) entre as seis espécies clássicas (VERGER et al., 1985) e as recentemente isoladas de mamíferos marinhos (VERGER et al., 2000). Sugeriu-se inclusive a constituição monoespecífica do gênero sendo a *B. melitensis* considerada a espécie representativa e as demais biovars (VERGER et al., 1985; VERGER et al., 1987). Entretanto, a organização clássica do gênero foi mantida porque apesar da similaridade genotípica, são observadas diferenças na patogenicidade e na preferência por determinados hospedeiros entre as diferentes espécies. Na tentativa de explicar tais diferenças, estudos começaram a buscar polimorfismos no DNA das espécies e marcadores moleculares capazes de distinguir as espécies e alguns de seus biovars (VIZCAÍNO et al., 2000).

A primeira tentativa de analisar a existência de variabilidade no DNA, que possibilitasse a diferenciação das espécies de *Brucella*, foi realizada pela análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), onde o DNA genômico das



espécies foi digerido com várias enzimas de restrição e os fragmentos gerados analisados por eletroforese em gel de agarose (O'HARA et al., 1985).

A eletroforese convencional, entretanto, não se mostrou um método poderoso para separação dos fragmentos obtidos com a digestão de todo genoma, e para superar os problemas resultantes da complexidade dos perfis gerados recorreu-se a separação dos fragmentos de restrição por eletroforese de campo pulsátil (PFGE), que permitiu uma maior identificação dos polimorfismos (VIZCAÍNO et al., 2000; CLOECKAERT; VIZCAÍNO, 2004).

Entretanto, a técnica PFGE possui algumas limitações importantes, como a necessidade de preparação do DNA bacteriano para realização dos testes, que envolve incubações extensas, de cerca de dois a quatro dias, e, sobretudo o custo relativamente alto do equipamento (ARBEIT, 1999).

Análises de alguns loci gênicos das espécies de *Brucella* através de RFLP, seguido da hibridação com sondas contendo sequências específicas dos genes estudados permitiu importantes descobertas, como a ausência de determinados genes em algumas espécies (FICHT et al., 1990; VIZCAÍNO et al., 1997; VIZCAÍNO et al., 2004).

A amplificação de determinados genes por PCR, seguido pela clivagem destes por enzimas de restrição, permitiu a identificação de padrões de restrição espécie-específicos nos genes estudados, permitindo a diferenciação de algumas espécies e biovars (BRICKER, 2002).

A técnica de PCR-RFLP permite a diferenciação de todas as espécies e biovars, pelos padrões de restrição gerados com o estudo de vários loci gênicos (*omp2a*, *omp 2b*, *omp25* e *omp31*) (BRICKER, 2004), entretanto possui como inconveniente a necessidade de utilização de um grande número de enzimas de restrição para identificação dos polimorfismos, o que encarece este tipo de análise.

A análise do polimorfismo de DNA em fragmentos amplificados randomicamente (RAPD) demonstrou variabilidade entre as estirpes bacterianas altamente conservadas (FEKETE et al., 1992; TCHERNEVA et al., 2000). Apesar de demonstrar a variabilidade entre as estirpes sem a necessidade de conhecimento da sequência para o pareamento específico dos *primers*, a técnica de RAPD-PCR é de difícil reprodutibilidade, uma vez que utiliza *primers* randômicos, pequenos e arbitrários, que hibridam de maneira fraca à sequência genômica e sob condições permissivas. Assim, mínimas alterações nas condições do teste podem influenciar a

eficiência na hibridação dos *primers* e alterar os resultados de maneira significativa (BRICKER, 2002).

A distribuição de sequências inseridas (ISs) ao longo do genoma, como a sequência IS711 ou IS 6501, identificada na *Brucella*, é uma fonte para indução de polimorfismo ao DNA (HALLING; ZEHR, 1990; HALLING et al., 1993). Estudos de hibridação do DNA genômico das cepas de referência e isolados de campo, digerido com a enzima *EcoRI*, utilizando a sequência IS 711 como sonda, indicaram variabilidade no número e distribuição das ISs nas diferentes espécies de *Brucella* (OUAHRANI et al., 1993).

O ensaio AMOS-PCR aborda o polimorfismo espécie-específico do elemento IS 711, para diferenciação das espécies de *B. abortus* (biovars 1, 2 e 4), *B. melitensis* (biovars 1, 2 e 3), *B. ovis* e *B. suis* (biovar 1), utilizando cinco *primers*, sendo um que hibridava ao elemento IS 711 e outros quatro que hibridavam às regiões adjacentes específicas a cada uma das espécies, identificando cada espécie pelo tamanho do produto amplificado (BRICKER; HALLING, 1994).

Como desvantagens desta técnica, podemos citar a dificuldade de alguns laboratórios em reproduzir os resultados do AMOS-PCR, devido à natureza multiplex do ensaio, onde os componentes e parâmetros de amplificação devem ser cuidadosamente controlados para permitir o máximo desempenho de cada *primer* (BRICKER, 2002) e adicionalmente, a deficiência do ensaio em diagnosticar os biovars 3 e 6 de *B. abortus*, observados recentemente como alguns dos mais prevalentes no Brasil (MINHARRO et al., 2009). Deve-se ainda considerar, que por natureza, as ISs são elementos móveis, e que a mobilidade destas sequências pode comprometer os ensaios baseados na identificação das mesmas.

A clonagem e o sequenciamento de vários genes de *Brucella* spp. permitiram o conhecimento de alguns marcadores espécie-específicos, dentre eles, principalmente os que codificam as proteínas de membrana (OMPs) tem se mostrado interessantes para identificação molecular das espécies de *Brucella* e alguns de seus biovars (VIZCAÍNO et al., 2000). Dentre as diferenças mais relevantes encontradas com o sequenciamento das OMPs, está uma deleção de 25 Kb envolvendo o *omp31* e outro *cluster* de genes, relacionadas à síntese de polissacarídeos, presente em todas as cepas de referência dos sete biovars de *B. abortus* (VIZCAÍNO et al., 2004).

O sequenciamento de todo genoma das *B. melitensis* 16M (DEL VECCHIO et al., 2002), *B. suis* 1330 (PAULSEN et al., 2002) e *B. abortus* 9-941 (HALLING et al., 2005) também permitiu uma extensa comparação dos genomas revelando elevada similaridade entre estas espécies, em relação à composição genética, estrutura e organização genômica. Entretanto, foram identificados alguns eventos de inserções e deleções entre os genomas, demonstrando polimorfismos que podem ser úteis na diferenciação das espécies (HALLING et al., 2005).

A comparação entre *B. melitensis* e *B. suis* havia revelado 33 regiões específicas do genoma, maiores do que 100 pb, para cada uma das espécies (PAULSEN et al., 2002). Vários destes fragmentos identificados como únicos, foram posteriormente identificados no genoma da *B. abortus* (HALLING et al., 2005), mas restaram 22 genes específicos para *B. suis* e um gene para *B. melitensis* (RATUSHNA et al., 2006).

Dentre os polimorfismos encontrados, destacam-se também a descoberta de dois fragmentos grandes, presentes nos genomas da *B. suis* e *B. melitensis*, que estão ausentes na *B. abortus*, sendo um de 2774 bp responsável pela codificação de proteínas de superfície, e outro de 25 Kb, já identificado previamente, responsável pela síntese de polissacarídeos (HALLING et al., 2005) e a presença de duas regiões específicas presentes no genoma da *B. abortus*, que podem ser úteis na identificação desta espécie, uma com 2 Kb responsável codificação de OMPs<sup>1</sup> e a outra com 4 Kb responsável pela codificação de um autotransportador<sup>2</sup> (HALLING et al., 2005).

Análises computacionais dos três genomas também permitiram a identificação de diferenças na sequência das espécies, validadas por PCRs e RT-PCRs, que testaram a transcrição dos genes. Dentre as diferenças encontradas, citam-se a ausência na *B. melitensis* de genes codificadores de sistemas de transporte de aminoácidos, presentes nas *B. suis* e *B. abortus*; a presença de genes codificadores de sistemas de transporte de permeases<sup>3</sup> identificados exclusivamente para *B. suis*; a ausência apenas no genoma da *B. abortus* de uma região de 25Kb contendo genes envolvidos na síntese de proteínas de membrana e da cadeia O e outros genes não caracterizados<sup>4</sup>, mas que podem ser novos fatores de virulência; a

---

<sup>1</sup> BruAb1\_0072

<sup>2</sup> BruAb2\_0168

<sup>3</sup> BR952/BR953

<sup>4</sup> BMEI10835/0837/0838/0840/0845-0847; BRA0420-0422/0427/0429/0430/0432

existência na *B. suis* de um cluster de genes potencialmente envolvidos em sistemas de secreção (*tra/trb*); a presença de um sítio específico para recombinase<sup>5</sup> identificado apenas na *B. melitensis* (RATUSHNA et al., 2006).

A sequência genômica completa da *B. melitensis* 16M também foi utilizada na construção de um microarray que permitiu a comparação do genoma desta espécie com as demais, revelou a duplicação de algumas ORFs na *B. ovis*<sup>6</sup>, *B. suis*<sup>7</sup>, *B. canis*<sup>8</sup> e *B. neotomae*<sup>9</sup>, e permitiu a descoberta de nove regiões distintas, designadas ilhas genômicas (GIs), que estavam ausentes nas outras cinco espécies. As sequências encontradas deletadas eram conservadas em várias cepas da mesma espécie e as ilhas genômicas ausentes numa dada espécie eram sempre restritas aquela espécie (RAJASHEKARA et al., 2004). Considerando-se que as ilhas genômicas ausentes em cada espécie são diferentes, e que em algumas espécies encontraram-se ORFs duplicadas, pode-se desenhar *primers* específicos, baseados nas deleções ou duplicações descritas para cada espécie, obtendo-se assim marcadores estáveis para identificação das mesmas.

García-Yoldi et al. (2006) desenvolveram um ensaio de multiplex PCR, denominado Bruce-ladder, utilizando oito pares de *primers*, que permitiu a identificação e diferenciação das cepas vacinais de *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev1 e de todas as espécies de *Brucella*, inclusive as isoladas de mamíferos marinhos. A diferenciação entre as espécies e cepas vacinais é realizada pela comparação do perfil dos produtos amplificados gerados, que foi diferente para todas as espécies e cepas testadas.

Os *primers* foram desenhados segundo diferenças descritas para espécies e cepas vacinais de *Brucella*, como (i) a deleção de 25 Kb compreendendo o gene *omp31* em todos os biovars de *B. abortus*, (ii) a deleção de 15 Kb compreendendo os gene *omp25*, *wboA* e *wboB* na *B. ovis*, (iii) a inserção de uma sequência IS711 ao gene *wboA* na cepa vacinal RB51 de *B. abortus*, (iv) a deleção de 702 bp no locus *ery* na cepa vacinal de S19 de *B. abortus*, (v) a mutação específica no gene *rpsL* na cepa vacinal Rev 1 de *B. melitensis*, (vi) a deleção de 976 pb no cromossomo I específica na *B. canis*, (vii) a deleção de 2,2 Kb no cromossomo II específica na *B.*

---

<sup>5</sup> BMEI1661

<sup>6</sup> BMEI1192; BMEI1201-1221; BMEI1815; BMEI10445, BMEI10718

<sup>7</sup> BMEI1192

<sup>8</sup> BMEI0901

<sup>9</sup> BMEI0200; BMEI10867

*neotomae*, (viii) a presença de um fragmento de 2,6 Kb específico para *B. suis*, ausente na *B. abortus* e *B. melitensis* e (ix) a presença de uma IS711 após a sequência do gene *bp26* nas espécies de *Brucella* isoladas de mamíferos marinhos (GARCÍA-YOLDI et al., 2006).

O ensaio foi testado em 72 amostras, entre isolados de campo de humanos e animais, e cepas de referência. Obtiveram-se os perfis esperados para todas as cepas e biovars estudados. Nenhum produto foi amplificado com o DNA de 23 bactérias, geneticamente e sorologicamente relacionadas à *Brucella*, demonstrando que o ensaio é altamente específico (GARCÍA-YOLDI et al., 2006).

Uma validação da metodologia Bruce-ladder foi posteriormente realizada, para tal foram escolhidos sete laboratórios europeus, e a mesma metodologia anteriormente padronizada, foi utilizada por todos os laboratórios, para testar 625 isolados de *Brucella*, de diversas localidades, incluindo amostras humanas e animais, e foram obtidos os padrões de banda esperados para cada espécie de quase todas as amostras testadas, exceto para nove (41,9%) de 21 amostras de *B. canis* testadas que apresentaram o padrão de bandas esperado para *B. suis* (LÓPEZ-GOÑI et al., 2008).

Apesar de permitir a diferenciação das várias espécies de *Brucella*, inclusive das cepas vacinais e ser bastante específico, segundo o autor, podemos citar como desvantagens deste último ensaio, a complexidade dos perfis de produtos amplificados gerados e a natureza multiplex do ensaio onde normalmente os limiares de detecção do teste costumam ser menores, e os parâmetros e componentes de amplificação devem ser cuidadosamente controlados para permitir o máximo desempenho de cada par de *primer*, e outra desvantagem que também nos parece bastante preocupante, é a incapacidade da metodologia em classificar corretamente quase metade das amostras de *B. canis* analisadas.

## **2. JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as limitações apontadas no diagnóstico microbiológico de *Brucella*, no que diz respeito à escolha correta dos materiais a serem cultivados e principalmente, as dificuldades de identificação das espécies pelos métodos fenotípicos convencionais, assim como as desvantagens apresentadas por alguns métodos moleculares, utilizados para identificação das espécies e biovars de *Brucella*, como é o caso (i) dos métodos baseados em PCR-RFLP de genes específicos, que apesar de permitirem uma identificação adequada das espécies e biovars, necessitam de um grande número de enzimas de restrição e do isolamento de *Brucella* visto que não podem ser utilizados diretamente em amostras clínicas, (ii) do AMOS-PCR que é um método de difícil reprodutibilidade, tem seu sistema de identificação baseado numa sequência móvel e não permite a identificação de alguns biovars bastante prevalentes em nosso país e adicionalmente, (iii) da metodologia Bruce-Ladder, que além de gerar padrões de amplificação difíceis de serem interpretados, ainda não discrimina corretamente as espécies de *B. canis* e *B. suis*.

Assim considerando que a chave para o sucesso, dos programas de erradicação da doença em animais, e do tratamento em seres humanos, depende da rapidez na obtenção do diagnóstico laboratorial definitivo, o escopo deste trabalho foi utilizar as descobertas de polimorfismos descritos nos genomas das espécies de *Brucella* spp., para desenhar *primers* espécie-específicos, que pudessem ser utilizados em PCRs que permitiriam a rápida diferenciação molecular das espécies, uma vez que poderiam ser aplicadas tanto para caracterização de colônias isoladas como teriam potencial de ser utilizadas diretamente em amostras clínicas humanas ou oriundas de animais de produção, domésticos ou silvestres, suspeitas de brucelose, como método único ou auxiliar no diagnóstico.

Dentre as vantagens em se padronizar PCRs para o diagnóstico diferencial das espécies, podemos ressaltar a possibilidade de utilização do ensaio para o diagnóstico direto das infecções por *Brucella* em diversos tipos de amostras clínicas, além de aliar os conhecimentos epidemiológicos em relação à preferência por determinados hospedeiros, para escolha da(s) PCR(s) a serem realizadas para cada caso em particular, e a maior facilidade de interpretação dos resultados.

### **3. OBJETIVOS**



### 3 OBJETIVOS

Tendo em vista as limitações apontadas no diagnóstico microbiológico de *Brucella*, as dificuldades de identificação das espécies pelos métodos fenotípicos convencionais, assim como as desvantagens apresentadas por alguns métodos moleculares, destacam-se como objetivos do trabalho os seguintes itens:

1. Desenhar *primers* específicos para detecção de seis espécies do gênero *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*, utilizando loci gênicos únicos, que contenham uma sequência polimórfica, capaz de diferenciar uma espécie das demais.

2. Padronizar reações em cadeia pela polimerase (PCRs) com finalidade diagnóstica e diferencial de cada espécie, para cada um dos *primers* desenhados;

3. Avaliar a especificidade analítica das PCRs padronizadas em amostras de referência e isolados de campo de *Brucella* e em bactérias geneticamente e sorologicamente relacionadas à *Brucella*;

4. Sequenciar os produtos amplificados gerados nas PCRs padronizadas e comparar, as sequências obtidas nas PCRs, com as sequências de *Brucella* disponíveis nos bancos de dados, a fim de caracterizar os loci gênico estudados como marcadores de polimorfismo espécie-específicos.

## **4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

#### 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Amostras das cepas de referência e isolados de campo de *Brucella* foram cultivadas e depois de obtidas culturas puras, elas foram submetidas à confirmação bioquímica e a extração de DNA com proteinase K. As alíquotas de DNA extraído foram submetidas à quantificação e amplificação com os *primers* ITS gênero-específicos para comprovar a eficiência da extração, e as amostras positivas foram posteriormente utilizadas na caracterização de marcadores moleculares polimórficos para cada espécie que permitissem o desenho de *primers*.

A busca de polimorfismos espécie-específicos que permitiram o desenho de *primers* foi baseada nas três estratégias abaixo:

- Amplificação randômica das amostras de *Brucella* com *primers* arbitrários (AP-PCR– *Arbitrarily Primed– Polymerase Chain Reaction*) e randômicos (RAPD) – realizada para caracterizar regiões que fossem conservadas para uma espécie e seus biovares, com a finalidade de posteriormente desenhar *primers* para estas regiões;
- Desenho de *primers* dirigidos a polimorfismos específicos presentes no DNA das espécies de *Brucella*, que estavam descritos na literatura e encontram-se destacados no Quadro 1 – foram escolhidas inicialmente três regiões, uma para cada espécie de *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis*, para quais foram desenhados *primers*, para diagnóstico e diferenciação das espécies;
- Desenho de *primers* dirigidos a polimorfismos específicos presentes no DNA das espécies de *Brucella*, descobertos na análise do alinhamento múltiplo das sequências do cromossomo I e II de *Brucella* que estavam disponíveis no GenBank até setembro de 2009 – foram comparados os genomas das espécies de *Brucella*, e analisados simultaneamente os eventos de deleções, inserções, mutações e sequências repetitivas (microssatélites) ou qualquer outro evento de polimorfismo entre as espécies para o desenho de *primers* espécie-específicos.

ESPÉCIE	POLIMORFISMO EM REGIÃO OU LOCI GÊNICO *
<i>B. melitensis</i>	<b>omp 31b</b> deleção 232 pb <sup>f</sup> <b>BMEI 1661</b> sítio específico para recombinase <sup>g</sup>
<i>B. suis</i>	<b>BMI 1192</b> ORF duplicada <sup>c</sup> <b>tra/trb</b> genes únicos envolvidos com sistemas de secreção <sup>g</sup> <b>BR952/BR953</b> genes únicos envolvidos c/ sistema transporte de permeases <sup>g</sup>
<i>B. abortus</i>	<b>omp 31</b> deleção 25kb <sup>d</sup> <b>GI-4/ GI-8</b> regiões com 40 ORFs deletadas <sup>c</sup> <b>BruAb1_0072/BruAb2_0168</b> regiões específicas com 2 Kb e 4 Kb, respectivamente <sup>e</sup>
<i>B. ovis</i>	<b>omp 2</b> possui 2 cópias do gene omp2a <sup>a</sup> <b>omp 25</b> deleção de 36 pb <sup>b</sup> <b>omp 25b/ wboA-wboB</b> deleção de 15 kb <sup>d</sup> <b>GI-1/ GI-2/ GI-5/ GI-7/ GI-9</b> regiões com 84 ORFs deletadas <sup>c</sup> <b>BMEI 1192/ BMEI 1201-1221/ BMEI 1815/ BMEII 0445/ BMEII 0718</b> ORFs duplicadas <sup>c</sup> <b>omp 22</b> pequena deleção 30 pb <sup>f</sup>
<i>B. canis</i>	<b>BMEI 0901</b> ORF duplicada <sup>c</sup> <b>GI-3</b> região com 38 ORFs deletadas <sup>c</sup>
<i>B. neotomae</i>	<b>BMEI 0200/ BMEII 0867</b> ORFs duplicadas <sup>c</sup> <b>GI-6</b> região com 17 ORFs deletadas <sup>c</sup>

\*Referências: <sup>a</sup> FICHT et al., 1990; <sup>b</sup> CLOECKART et al., 1995; <sup>c</sup> RAJASHEKARA et al., 2004; <sup>d</sup> VIZCAÍNO et al., 2004;

<sup>e</sup> HALLING et al., 2005; <sup>f</sup> GARCÍA-YOLDI et al., 2005; <sup>g</sup> RATUSHNA et al., 2006.

Quadro 1 – Regiões ou loci gênicos de *Brucella* spp., para os quais já foi relatada a existência de polimorfismos no DNA e que pode ser testado para diferenciação molecular das espécies

Para cada par de *primers* desenhado foi determinada a temperatura de anelamento (Ta<sup>o</sup>C) ótima e a melhor concentração dos reagentes para reação. E se prosseguiu a determinação da especificidade analítica da PCR com o programa *Primer BLAST* (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e teste nas 18 cepas de referência de *Brucella*, compreendendo as *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e seus biovars, além da *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, e em 231 isolados de campo, incluindo *B. abortus*, *B. canis* e *B. suis*.

Por fim, os produtos obtidos nas PCRs padronizadas foram sequenciados em sequenciador automático de ácidos nucléicos ABI 377 e as sequências obtidas foram analisadas e comparadas às demais sequências de *Brucella* spp disponíveis no Genbank.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostras

As seguintes amostras foram mantidas em nosso laboratório e utilizadas ou para a busca de marcadores moleculares baseados em RAPD, ou na determinação da especificidade analítica das PCRs padronizadas:

- (i) 17 cepas de referência das seis espécies clássicas de *Brucella* e seus respectivos biovars (Quadro 2), gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa da Costa, Depto. De Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- (ii) Uma cepa de referência de *B. canis* (ATCC 233365) proveniente do acervo da Coleção de Cultura de Bactérias, Laboratório de Microrganismos de Referência, Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde – INCQS, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ;
- (iii) 205 isolados de campo *B. canis* pertencentes à coleção da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lara Borges Keid, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP;
- (iv) 21 isolados de campo de *B. abortus*, gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup>. Eliana Scarcelli Pinheiro, Pesquisadora do Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução;

- (v) DNA de cinco isolados de campo *B. suis* provenientes do Núcleo de Coleção de Microrganismos, Depto. Técnico de Saúde do Instituto Adolfo Lutz.

ESPÉCIE	BIOVAR	ESTIRPE <sup>a</sup>
<i>B. melitensis</i>	1	16 M (ATCC 23456; BCCN R1)
	2	63/9 (ATCC 23457; BCCN R2)
	3	Ether (ATCC 23458; BCCN R3)
<i>B. suis</i>	1	1330 (ATCC 23444; BCCN R12)
	2	Thomsen (ATCC 23445; BCCN R13)
	3	686 (ATCC 23446; BCCN R14)
	4	40 (ATCC 23447; BCCN R15)
<i>B. abortus</i>	1	544 (ATCC 23448; BCCN R4)
	2	86/8/59 (ATCC 23449; BCCN R5)
	3	Tulya (ATCC 23450; BCCN R6)
	4	292 (ATCC 23451; BCCN R7)
	5	B3196 (ATCC 23452; BCCN R8)
	6	870 (ATCC 23453; BCCN R9)
<i>B. ovis</i>	7	63/290 (ATCC 25840)
	8	
<i>B. canis</i>	9	RM6/66 (ATCC 23365; BCCN R18)
<i>B. neotomae</i>	10	5K33 (ATCC 23459; BCCN R16)

<sup>a</sup> ATCC - American Type Culture Collection; BCCN - Brucella Culture Collection, Nouzilly, France

Quadro 2 – Amostras de referência de *Brucella*, identificadas por espécie, biovar e estirpe, utilizadas na determinação da especificidade analítica das PCRs padronizadas

## 5.2 Manutenção das Cepas Bacterianas

As cepas padrão e isolados de campo de *Brucella* foram mantidas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, da FMVZ – USP – SP, congeladas a –80°C em caldo Fosfato Triptose (OXOID) acrescido de glicerol a 25%. As culturas foram realizadas em agar Triptose (OXOID), acrescido de soro fetal



bovino a 5%, e incubadas a 37°C em aerobiose ou microaerofilia dependendo das exigências da espécie, por 72 horas ou até aparecimento de colônias.

### **5.3 Cultivo e identificação das amostras de *Brucella* spp.**

As amostras de referência de *Brucella* foram descongeladas e cultivadas em agar Triptose (Tryptose Agar – DIFCO) acrescido de soro fetal bovino a 5%. As placas de cultivo foram incubadas a 37°C em aerobiose ou microaerofilia, dependendo das exigências da espécie, por 72 horas ou até aparecimento de colônias.

As colônias isoladas foram identificadas segundo Alton et al. (1976), sendo primeiramente submetidas às provas de catalase e oxidase, e paralelamente cultivadas nos caldos nitrato (Nitrate Broth – DIFCO) e uréia (Urea Broth – DIFCO), e nos meios de SIM (Sulfide Indol Motility- BBL), TSI (Triple Sugar Iron Agar – DIFCO), Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar – DIFCO), e em tubos contendo agar Triptose (Tryptose Agar – DIFCO) onde em seguida foram colocadas tiras com papel filtro banhado com acetato de chumbo para verificação da produção de H<sub>2</sub>S. As colônias também foram cultivadas em placas contendo diferentes concentrações dos corantes Tionina (1:25.000; 1:50.000 e 1:100.000) e Fucsina básica (1:50.000 e 1:100.000). E adicionalmente, foi realizada a observação da morfologia lisa ou rugosa das colônias pelas provas da acriflavina e coloração pelo cristal de violeta.

As características bioquímicas e morfológicas diferenciais das espécies de *Brucella* e seus biovares estão apresentadas no Quadro 3, adaptado de Alton et al. (1976)

Espécie	Biovar	Necessidade de CO2	Provas Bioquímicas											Provas Morfológicas				
			Catalase	Oxidase	Reação de Nitrato	Atividade Ureásica	Motilidade (SIM)	Utilização açúcares (TSI)	Utilização de Citrato	Produção de H2S	Cultivo com corantes *					Acriflavina	Coração	
											Tionina			Fucsina				Cristal Violeta
										a	b	c	b	c				
<i>B. melitensis</i>	1	-	+	+	+	+	(variável)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	2	-	+	+	+	+	(variável)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	3	-	+	+	+	+	(variável)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
<i>B. abortus</i>	1	+(-)**	+	+	+	+	(1-2h)***	-	-	-	+	-	-	-	+	+	Suspensão	Não se coram
	2	+	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Suspensão	Não se coram
	3	+(-)	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	4	+(-)	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	Suspensão	Não se coram
	5	-	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	6	-	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	- ou +	-	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	9	- ou +	+	+	+	+	(1-2h)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	+	(0-30min)	-	-	-	++	+	+	+	-	-	Suspensão	Não se coram
	2	-	+	+	+	+	(0-30min)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Suspensão	Não se coram
	3	-	+	+	+	+	(0-30min)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
	4	-	+	+	+	+	(0-30min)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	Suspensão	Não se coram
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	-	+	+	(0-30min)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	Suspensão	Não se coram
<i>B. ovis</i>	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	Aglutinação	Coram-se
<i>B. canis</i>	1	-	+	+	+	+	(0-30min)	-	-	-	-	+	+	+	-	±	Aglutinação	Coram-se

\* a diferenciação das espécies se faz em ágar triptose com as seguintes diluições do corante a) 1:25.000, b) 1:50.000 e c) 1:100.000; \*\* +(-) prova geralmente positiva, mas pode encontrar-se variedades negativas, como a cepa 19; \*\*\* o biotipo 544 é atípico e pode não apresentar atividade ureásica

Quadro 3 – Características bioquímicas e morfológicas diferenciais das espécies do Gênero *Brucella* e seus biovars, adaptado de Alton et al. (1976).

#### 5.4 Extração de DNA das amostras de *Brucella* pelo Método da Proteinase K (PK)

Depois de identificadas, as colônias tiveram seu DNA extraído, e para tal uma alçada da cultura pura foi adicionada a microtubos de PCR contendo 1mL de uma solução tampão de Tris-EDTA (10mM TrisHCl, pH 8 e 1mM EDTA, pH 8). Os microtubos contendo cultura pura foram submetidos à fervura a 105°C por cerca de 40 minutos até uma hora, para inativação das brucelas e para que o material pudesse então ser manipulado na bancada sem risco de contaminação do manipulador. Depois de inativadas, as amostras estavam prontas para extração e podiam ser congeladas a -20°C para serem submetidas à extração de DNA quando conveniente.

O protocolo de extração de DNA bacteriano com PK foi realizado segundo Ausubel et al. (1999). A solução tampão de TE contendo as bactérias oriundas de cultura pura foi centrifugada a 13.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi descartado, enquanto o sedimento foi mantido em incubação com 400µL de solução de lise composta por 1% SDS, 100mmol NaCl, 10mmol/L Tris-HCl pH 8, 25mmol/L EDTA pH 8 e 10µg/mL PK (Invitrogen) *overnight* a 37°C ou por duas horas a 56°C.

Para a purificação das amostras, adicionou-se 500µL de fenol, e a mistura depois de homogeneizada, foi centrifugada a 13.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 400µL) contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo, onde posteriormente foi adicionado volume equivalente ao recuperado de uma solução de fenol-clorofórmio (v/v). A mistura foi homogeneizada e novamente centrifugada a 13.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (cerca de 300µL) foi novamente transferido a um novo microtubo e a ele foi adicionado o mesmo volume recuperado de uma solução de propanol. Após homogeneização manual, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no mínimo duas horas, ou overnight.

Seguiu-se a precipitação das amostras, procedendo à centrifugação destas a 13.000g por 30 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi re-suspendido em 1mL de etanol a 70%. O material foi centrifugado pela segunda vez a

13.000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi novamente desprezado. Os microtubos foram deixados em posição invertida sobre papel toalha a temperatura ambiente, ou em banho-seco a 56°C por 10 minutos, até o pellet estar completamente seco.

Por fim, adicionou-se 100µL de TE nas amostras e estas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 30 minutos. Após uma nova homogeneização as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.

### **5.5 Quantificação do DNA Extraído**

Alíquotas da solução de DNA extraído, de todas as amostras padrão de *Brucella*, foram diluídas 1:100 em TE e posteriormente submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU<sup>®</sup> 640 (BECKMAN, Fullerton, CA, USA). A razão das absorvâncias obtidas por leitura espectrofotométrica das amostras nos comprimentos de onda 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) foi considerada para a determinação da concentração de DNA e do grau de pureza da amostra.

### **5.6 Amplificação das amostras de *Brucella* spp. com os primers gênero-específicos ITS<sub>66</sub> e ITS<sub>279</sub>**

Todas as amostras de *Brucella* spp. descritas no 5.1, depois de extraídas, foram submetidas a PCR com os primers gênero-específicos ITS<sub>66</sub> e ITS<sub>279</sub>, segundo o protocolo por Keid et al. (2007), para assegurar o sucesso do processo de extração antes de serem utilizadas para amplificação randômica e nos testes de especificidade analítica dos primers.

## 5.7 Busca de marcadores moleculares espécie-específicos baseados em amplificação randômica

Utilizou-se amplificação randômica com *primers* arbitrários (AP-PCR–*Arbitrarily Primed– Polymerase Chain Reaction*) e randômicos (RAPD) para tentar caracterizar marcadores moleculares espécie-específicos que fossem conservados para diversos biovares de uma mesma espécie, para posteriormente desenhar *primers* para estas regiões.

Esta metodologia foi utilizada visto que marcadores derivados de RAPD, denominados SCARs (*Sequence characterized amplified region*), já haviam sido caracterizados para *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria* spp. e *Trypanosoma cruzi* (MORGAN et al., 1996; BRISSE et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2004) e que a análise de polimorfismo em fragmentos amplificados randomicamente (RAPD) também já havia revelado padrões de amplificação diferentes para 25 cepas de *Brucella* (FEKETE et al., 1992).

A metodologia seguida para as reações de amplificação randômica por AP-PCR e RAPD, diferenciou-se apenas nos *primers* e na temperatura de anelamento utilizados.

### 5.7.1 Primers

A amplificação randômica por AP-PCR foi realizada utilizando-se o *primer* APO7F (5'- GAK GCA RCT WGA AAA GCA -3'), que estava disponível em nosso laboratório e apesar do tamanho relativamente grande (18pb) foi utilizado por possuir alguns sítios degenerados.

A amplificação randômica por RAPD foi realizada com quatro *primers*, o P<sub>3</sub> (5'- CGG CCA CTG T -3'), P<sub>4</sub> (5'- CGG CCC CTG T -3') e P<sub>5</sub> (5'- CGG CCC CGG T -3') que já haviam sido descritos por Fekete et al. (1992) e o OPLO<sub>4</sub> (5'- GAC TGC ACA C -3') que já havia sido referido por Tcherneva et al. (2000), sendo que cada *primer* foi utilizado isoladamente numa reação diferente.

### 5.7.2 Amostras

O ensaio de AP-PCR com *primer APO7F* foi testado nas 18 amostras de referência de *Brucella* e em 19 cepas isoladas de campo de *B. canis*, entretanto devido à dificuldade em se analisarem os diferentes padrões de bandas dentro de um mesmo gel de agarose e a dificuldade ainda maior em analisar estes padrões entre géis diferentes, os ensaios de RAPD foram realizados apenas com as 18 amostras de referência de *Brucella* e três cepas isoladas de campo de *B. canis*, que podiam ser analisados dentro de um mesmo gel de agarose.

### 5.7.3 Condições de Amplificação

As reações de amplificação foram realizadas em 50µl de volume final consistindo de 5µl de *primer* (10pmol/µl); 2,5µl de 10x PCR *Buffer* (Invitrogen); 1,0µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,5µl de dNTP (10mM) e 0,3µl de Platinum *TaqDNA* polimerase (Invitrogen).

Como as concentrações finais de DNA extraído foram diferentes para cada um dos biovares das espécies de referência *Brucella*, assim como para as cepas de campo de *B. canis*, com a finalidade de não favorecer a amplificação de algum biovar ou espécie, adicionou-se volumes diferentes de DNA extraído a reação, mas sempre totalizando 20ng de DNA na reação final.

As condições de amplificação por AP- PCR consistiram de desnaturação inicial de 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C durante 10 minutos.

Entretanto, as condições de amplificação por RAPD foram alteradas, de maneira a tornarem-se mais permissivas e favorecerem a hibridação e amplificação dos *primers*, sendo a desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 37°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e a extensão final de 72°C durante 10 minutos.

#### 5.7.4 Visualização dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados randomicamente foram analisados juntamente com o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de base (pb) (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder), por eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM).

Em cada orifício do gel, foram depositados 10 µl de cada amostra misturada a dois µl de corante de amostra (30% de glicerol; 0,25% de azul de bromofenol). O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm e após a corrida eletroforética, foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5µg/ml) por 15 a 20 minutos. A visualização dos padrões de amplificação foi realizada através de transluminação com luz ultravioleta.

#### 5.7.5 Purificação dos produtos amplificados randomicamente

Após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse que poderiam representar possíveis marcadores moleculares, que estavam presentes em apenas uma espécie e se mantinham em seus biovares, foram recortadas do gel e purificadas com o *kit* GFX™ (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 5.7.6 Clonagem dos produtos amplificados randomicamente

O kit TOPO TA *cloning kit for sequencing* (Invitrogen) foi empregado para a clonagem dos produtos obtidos nos ensaios de amplificação randômica que se destacaram como possíveis marcadores moleculares para alguma espécie. Os produtos de PCR foram inseridos em plasmídeos pCR®4-TOPO® e o produto final

foi empregado para transformar linhagens de *Escherichia coli* TOP10, seguindo estritamente as condições do fabricante do kit. As colônias transformantes (resistentes a Ampicilina) foram recuperadas e submetidas à extração de DNA plasmidial.

#### 5.7.7 Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada segundo protocolo descrito por Ausubel et al. (1999). Inicialmente, centrifugou-se 1,5mL das colônias transformantes a 5.000g por 1 minuto a 12°C, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 100µL de uma solução de GTE (50mM glicose, 25mM Tris HCL pH8, 10mM EDTA). A mistura foi deixada em incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao final deste tempo, adicionou-se 200µL de uma solução de NaOH/SDS (0,2M NaOH e 1% SDS (p/v)), procedeu-se a homogeneização e o microtubo contendo as amostras foi deixado em gelo por 5 minutos.

Seguiu-se uma nova centrifugação a 5.000g por 3 minutos a 12°C, o sobrenadante (cerca de 400µL) contendo o DNA, foi recuperado para um novo microtubo e adicionou-se 800µL de etanol 95%. A amostra permaneceu por 2 minutos em descanso a temperatura ambiente e seguiu-se uma terceira centrifugação a 5.000g por 3 minutos a 12°C. Lavou-se o pellet com 1mL de etanol 70% e os microtubos foram colocados em banho-seco a 56°C por 10 minutos, até o pellet estar completamente seco.

Por fim, adicionou-se 30µL de TE nas amostras e estas foram homogeneizadas e incubadas em banho-seco a 56°C por 15 minutos. Após uma nova homogeneização, as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até a sua utilização.



### 5.7.8 PCR para obtenção de material para o sequenciamento a partir do plasmídeo

Após extração, os plasmídeos foram usados como amostra em uma PCR empregando os *primers* T<sub>3</sub>(5´- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3´) e T<sub>7</sub> (5´- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3´) ou M<sub>13F</sub> (5´- GTA AAA CGA CGG CCA G -3´) e M<sub>13R</sub> (5´- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3´) disponíveis no *kit* para clonagem e complementares a regiões do plasmídeo.

Algumas tentativas foram realizadas para determinação das condições de reação de PCR e os melhores resultados foram obtidos realizando-se as PCRs em 50 µl de volume final consistindo de 31,4µl de água ultrapura; 5,0µl de 10x PCR *Buffer* (Invitrogen); 2,5µl de cada *primer* (10pmol/µl); 2,0µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 1,0µl de dNTP (10mM); 0,6µl de Platinum *Taq*DNA polimerase (Invitrogen) e 5,0µl de DNA plasmidial extraído.

Após determinação da melhor temperatura de anelamento dos *primers*, as melhores condições de amplificação foram determinadas em desnaturação inicial de 94°C durante 3 minutos; 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 49,7°C por um minuto e 72°C por um minuto e 30 segundos e extensão final de 72°C durante 10 minutos.

Os produtos desta PCR correspondiam a um fragmento do tamanho do inserto que foi adicionado ao plasmídeo somado a cerca de 100 nucleotídeos correspondentes a regiões do plasmídeo que flanqueiam o sítio de clonagem quando foram utilizados os *primers* T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> ou com cerca de 230 nucleotídeos quando foram utilizados os *primers* M<sub>13F</sub> e M<sub>13R</sub>.

### 5.7.9 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo protocolo de terminação de Sanger, conforme especificado abaixo.

#### 5.7.9.1 Purificação dos produtos amplificados por $T_3$ e $T_7$ ou $M_{13F}$ e $M_{13R}$

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram recortados do gel de agarose a 1,5% com lâmina de bisturi. Esses fragmentos foram eluídos do gel e a purificação do DNA foi realizada com o *kit* GFX<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante.

#### 5.7.9.2 Quantificação dos Produtos de PCR Purificados

Realizou-se uma nova eletroforese para estimar a concentração de DNA presente nas amostras purificadas. Para isso, comparou-se uma alíquota de 5  $\mu$ l do produto purificado com o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA), utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, para se obter a concentração de DNA presente nas amostras em ng/ $\mu$ l.

#### 5.7.9.3 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento utilizou-se o *kit* ABI PRISM<sup>TM</sup> Big Dye Terminator<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) e as quantidades de reagentes utilizados na reação foram determinados a partir da concentração do DNA purificado. Para uma reação com 20 $\mu$ l de volume final, foram utilizados 4 $\mu$ L de BigDye 3.1 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>), 4 $\mu$ L de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems<sup>TM</sup>), 0,4 $\mu$ L de cada *primer* (10 pmol/ $\mu$ L) senso e antisenso em reações separadas, 20ng do DNA e água ultrapura q.s.p. 20 $\mu$ L.

A reação de sequenciamento foi realizada sempre sob as seguintes condições, uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 40 ciclos de 96 °C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 4 minutos. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4°C embrulhadas em folhas de alumínio até a sua precipitação.

#### 5.7.9.4 Precipitação do DNA

Para precipitação das amostras, adicionaram-se 80 µl de isopropanol a 75% (v/v em água). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente em local escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g por 25 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 250 µl de etanol a 70% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos a 25°C. O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 95°C por cerca de 5 minutos, até a secagem completa dos microtubos. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do sequenciamento.

Antes de serem submetidas à eletroforese em sequenciador automático modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems, USA), as amostras foram homogeneizadas com 3,4 µl de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95° por 3 min e colocadas no gelo por 2 min.

#### 5.7.9.5 Edição de sequências

Os cromatogramas gerados a partir do sequenciamento, para as sequências senso e antisenso de cada clone, foram submetidos ao aplicativo Phred/Phrap online<sup>1</sup> para avaliação da qualidade das bases, sendo utilizadas apenas as posições com score maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases sequenciadas.

O *contig* entre as sequências senso e antisenso de cada clone foi obtido com o aplicativo CAP3 online<sup>2</sup>. Os *contigs* obtidos foram posteriormente submetidos à análise pelo aplicativo online VecScreen<sup>3</sup>, com o intuito de verificar contaminações por vetor. Utilizado o programa Bioedit v. 7.0.9.0, as regiões correspondentes ao

---

<sup>1</sup> Phred/Phrap Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2009.

<sup>2</sup> CAP 3 Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2009.

<sup>3</sup> VecScreen Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>>. Acesso em: 2009.

vetor pCR®4-TOPO® foram extraídas das sequências dos *contigs* e a sequência final de cada possível marcador foi submetida à BLASTn<sup>4</sup> e comparadas as sequências disponíveis nos bancos de dados online.

## 5.8 Busca de marcadores moleculares espécie-específicos baseados em polimorfismos de sequências de DNA

Utilizando-se três regiões polimórficas no DNA de *B. canis*, *B. ovis* e *B. abortus*, descritas na tabela 1, foram desenhados três pares de *primers*, com características termodinâmicas compatíveis entre si, que foram testados para padronizar PCRs com finalidade diagnóstica para diferenciação molecular destas espécies, como descrito a seguir.

### 5.8.1 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de *B. canis* (*BcanS* 307\_328 e *BcanAS* 528\_546)

Segundo a descrição de Rajashekara et al. (2004), da existência de uma deleção de 976pb no DNA do cromossomo I de *B. canis*, confirmada pelo próprio autor com o par de *primers* BMEI 1434F (5´- GCC AGC CAC AGG ATC AGG TGA T -3´) e BMEI 1436R (5´- GGA TCC GTT CGT TTC GCT CG -3´) e por López-Goñi et al. (2008) com o par de *primers* BMEI 1436f (5´- ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT -3´) e BMEI 1435r (5´- TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC -3´), utilizou-se também esta deleção para se desenhar um par de *primers*, diferencial para *B. canis*, que flanqueassem a região da deleção, obtendo-se assim a amplificação de um fragmento menor para a *B. canis*, do que para as demais espécies que não possuem a deleção, como demonstrado no Figura 1.

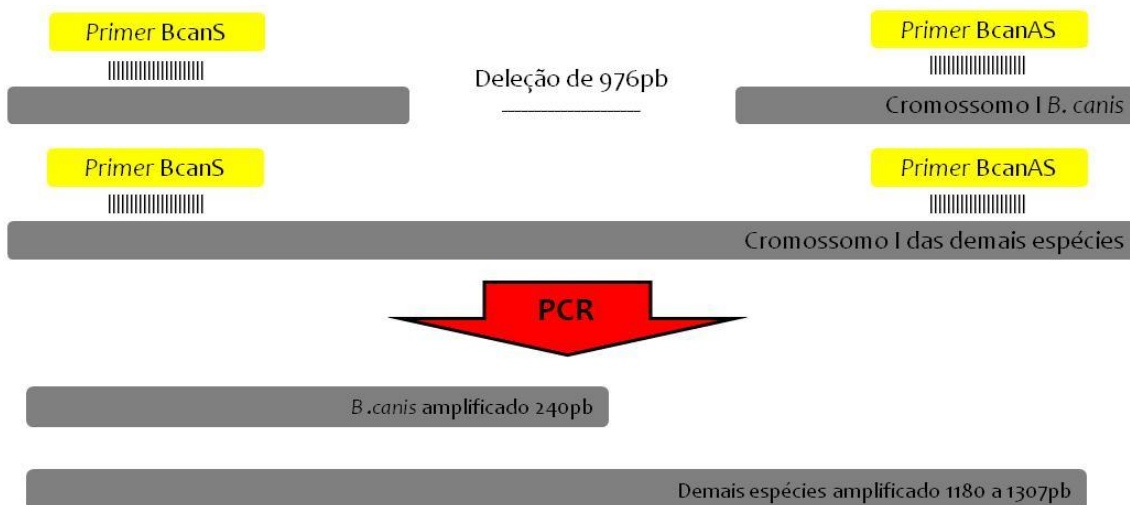
Assim, no programa Bioedit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999), foi realizado o alinhamento manual de uma parte da sequência do cromossomo I de *B. canis* ATCC

---

<sup>4</sup> BLASTn Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2009.

23365<sup>5</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>6</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>7</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>8</sup>, *B. suis* 1330<sup>9</sup>, *B. melitensis* biovar Abortus 2308<sup>10</sup>, *B. abortus* biovar 1 str. 9-941<sup>11</sup>, *B. abortus* S19<sup>12</sup>, *B. melitensis* 16M<sup>13</sup> e *B. ovis* ATCC 25840<sup>14</sup> disponíveis no GenBank, localizou-se a região da deleção na *B. canis* e utilizou-se a sequência conservada em todas as espécies que flanqueia a deleção na *B. canis* para o desenho de um novo par de *primers*, denominado de BcanS 307\_328 (5'- AAA GTG TAA ACC GCT GCC ATA A -3') e BcanAS 528\_546 (5'- AAC AAG CCG CAA ACG AAA G -3'), com o programa *Primer Premier 5.0*<sup>15</sup>.

A especificidade dos *primers* foi testada pelo aplicativo *Primer BLAST*<sup>16</sup> que revelou amplificação dos seguintes fragmentos: 240 pb *B. canis* ATCC 23365 , 1180 pb para *B. ovis* ATCC 25840, 1266 pb para *B. melitensis* biovar Abortus 2308, *B. abortus* biovar 1 str. 9-941, *B. abortus* S19 e *B. melitensis* 16M, e 1307 pb para *B. suis* ATCC 23445 e *B. suis* 1330



**Figura 1 – Desenho esquemático da localização dos *primers* BcanS 307\_328 e BcanAS 528\_546 frente a deleção estudada de *B. canis* e dos tamanhos dos amplificadas esperados**

<sup>5</sup> (gi|161334802|gb|CP000872.1)

<sup>6</sup> (gi|163673000|gb|CP000911.1)

<sup>7</sup> (gi|163842277|ref|NC\_010169.1)

<sup>8</sup> (gi|163673000|gb|CP000911.1)

<sup>9</sup> (gi|56968325|ref|NC\_004310.3)

<sup>10</sup> (gi|82698932|ref|NC\_007618.1)

<sup>11</sup> (gi|62288991|ref|NC\_006932.1)

<sup>12</sup> (gi|189023268|ref|NC\_010742.1)

<sup>13</sup> (gi|17986284|ref|NC\_003317.1)

<sup>14</sup> (gi|148370077|gb|CP000708.1)

<sup>15</sup> Produced by Primer Premier, PREMIER Biosoft International, www.Premier Biosoft.com

<sup>16</sup> Aplicativo disponível online em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)>. Acesso em:2009.

### 5.8.2 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de *B. ovis* (BovS 126\_149 e BovAS 571\_593)

Utilizou-se as descrições de Vizcaíno et al. (2004) e García-Yoldi et al. (2006) de uma deleção de 15kb, incluindo os genes *omp 25b* e *wboA – wboB* no cromossomo I de todas as cepas de *B. ovis*, para desenhar um par de *primers* diferencial para esta espécie. Neste caso utilizou-se também a região que flanqueava a deleção para desenho dos primers e como resultado, espera-se obter amplificação de um fragmento correspondente tamanho do sítio de anelamento dos *primers* na *B. ovis*, e não se esperava amplificação para as outras espécies, pois o tamanho do fragmento a ser amplificado deveria ser maior do que os 15kb da deleção, o que ainda é impossível com as condições de reação utilizadas, como demonstrado na Figura 2.

Assim, no programa Bioedit v. 7.0.9.0, alinhou-se manualmente uma parte das sequências do cromossomo I de *B. melitensis* biovar Ovis 63/290 site of large deletion involving *omp25b* and *wboA*<sup>17</sup>, *B. ovis* ATCC 25840<sup>18</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>19</sup>, *B. melitensis* 16M<sup>20</sup>, *B. abortus* biovar 1 str. 9-941<sup>21</sup>, *B. canis* ATCC 23365<sup>22</sup> disponíveis no GenBank, localizou-se a região da deleção e utilizou-se a sequência conservada em todas as espécies que flanqueava a deleção na *B. ovis* para o desenho de um novo par de *primers*, denominado de BovS 126\_149 (5'- GTT CGA GAG AAG CAC GAT TAT CG -3') e BovAS 571\_593 (5'- GCC GCA TAC AGG ATT GTG ATA GA -3') com o programa *Primer Premier 5.0*<sup>23</sup>.

A especificidade dos *primers* foi testada pelo aplicativo *Primer BLAST*<sup>24</sup>. A busca de especificidade revelou amplificação de fragmento com 468pb apenas para *B. ovis* ATCC 25840 e *B. melitensis* biovar Ovis 63/290 site of large deletion involving *omp25b* and *wboA*.

<sup>17</sup> (gi|46251223|gb|AY484543.1|)

<sup>18</sup> (gi|148558820|ref|NC\_009505.1|)

<sup>19</sup> (gi|163842277|ref|NC\_010169.1|)

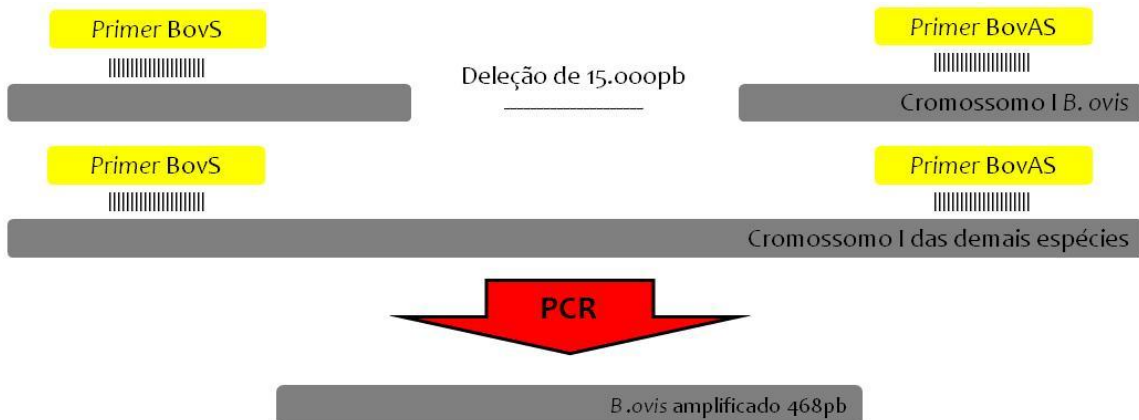
<sup>20</sup> (gi|17986284|ref|NC\_003317.1|)

<sup>21</sup> (gi|62288991|ref|NC\_006932.1|)

<sup>22</sup> (gi|161617991|ref|NC\_010103.1|)

<sup>23</sup> Produced by Primer Premier, PREMIER Biosoft International, www.Premier Biosoft.com

<sup>24</sup> Aplicativo disponível online em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)>. Acesso em:2009.



**Figura 2 – Desenho esquemático da localização dos primers BovS 126\_149 e BovAS 571\_593 frente a deleção estudada de *B. ovis* e do tamanho do amplificado esperado**

### 6.8.3 Desenho de primer espécie-específico para diagnóstico de *B. abortus* (*BabS* 1484\_1502 e *BabAS* 1893\_1874)

Desenhou-se um par de primers diferencial para *B. abortus*, considerando-se a existência de uma deleção de 25kb no cromossomo II de todas as cepas de referência dos sete biovars de *B. abortus*, compreendendo o gene *omp31* e outro cluster de genes, descrita por Vizcaíno et al. (1997); Vizcaíno et al. (2004) e Halling et al. (2005).

Como se utilizou para o desenho dos primers a sequência conservada em todas as espécies, que flanqueava a deleção na *B. abortus*, para esta espécie espera-se obter amplificação de tamanho correspondente ao sítio de anelamento dos primers. Para as outras espécies o tamanho do fragmento a ser amplificado deveria corresponder aos 25kb da deleção mais a região correspondente ao anelamento dos primers, o que ainda é impossível com as condições de reação utilizadas, portanto nas outras espécies não se espera amplificação, como demonstrado na Figura 3.

No programa Bioedit v. 7.0.9.0, alinhou-se manualmente as sequências *B. melitensis* Bme18 gene, partial cds; Bme19, Bme16, Bme17, Bme20, Bme21, Bme22, Bme23, Bme24, Bme25, Bme26, Bme27, Bme28, Bme29, Bme30, Bme31, Bme1, Bme2, Bme3, Bme4, outer membrane protein (*omp31*), Bme6, Bme7, Bme8,

Bme9, Bme10, Bme11, Bme12, Bme13, and Bme14 genes, complete cds; and Bme15 gene, partial CDs<sup>25</sup> e *B. melitensis* biovar Abortus 2308 chromosome II, complete sequence<sup>26</sup> disponíveis no GenBank, para confirmar a deleção.

Posteriormente, alinharam-se estas duas sequências às demais sequências do cromossomo II de *B. melitensis* biovar Abortus 2308<sup>27</sup>, *B. abortus* biovar 1 str. 9-941<sup>28</sup>, *B. abortus* S19<sup>29</sup>, *B. canis* ATCC 23365<sup>30</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>31</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>32</sup>, *B. suis* ATCC 23445<sup>33</sup>, *B. suis* 1330<sup>34</sup>, *B. melitensis* 16M<sup>35</sup> e *B. ovis* ATCC 25840<sup>36</sup> e utilizou-se a sequência conservada em todas as espécies que flanqueava a deleção na *B. abortus* para o desenho de um novo par de *primers*, denominado de BabS 1484\_1502 (5'- GTC CTG TGG TCC TGA TGG G -3') e BabAS 1893\_1874 (5'- GAT ACG TGC AAC GGT GAG TG -3') com o programa *Primer Premier 5.0*<sup>37</sup>.

A especificidade dos *primers* foi testada pelo aplicativo *Primer BLAST*<sup>38</sup>. A busca de especificidade revelou amplificação de fragmento com 410 pb apenas para *B. abortus* S19, *B. abortus* biovar 1 str. 9-941 e *B. abortus* strain 544 uracil permease homolog (bme16) and Bme11 (bme11) genes, partial cds<sup>39</sup>.

<sup>25</sup> (gi|16740531|gb|AF076290.2|AF076290)

<sup>26</sup> (gi|83268957|ref|NC\_007624.1)

<sup>27</sup> (gi|82698932|ref|NC\_007618.1)

<sup>28</sup> (gi|62288991|ref|NC\_006932.1)

<sup>29</sup> (gi|189023268|ref|NC\_010742.1)

<sup>30</sup> (gi|161334802|gb|CP000872.1)

<sup>31</sup> (gi|163673000|gb|CP000911.1)

<sup>32</sup> (gi|163842277|ref|NC\_010169.1)

<sup>33</sup> (gi|163673000|gb|CP000911.1)

<sup>34</sup> (gi|56968325|ref|NC\_004310.3)

<sup>35</sup> (gi|17986284|ref|NC\_003317.1)

<sup>36</sup> (gi|148370077|gb|CP000708.1)

<sup>37</sup> Produced by Primer Premier, PREMIER Biosoft International, www.Premier Biosoft.com

<sup>38</sup> Aplicativo disponível online em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd)>. Acesso em:2009.

<sup>39</sup> (AF076288.1)



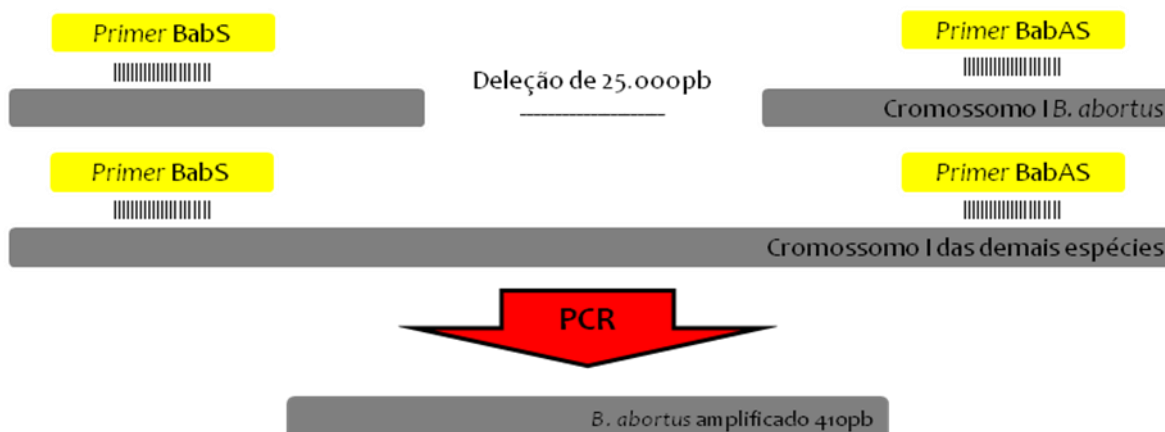


Figura 3 – Desenho esquemático da localização dos *primers* BabS 1484\_1502 e BabAS 1893\_1874 frente a deleção estudada de *B. abortus* e do tamanho do amplificado esperado

#### 6.8.4 Desenho de novo primer espécie-específico para diagnóstico de *B. abortus* (*BabI*)

Visto que o par de *primers* BabS e BabAS, apresentou os resultados esperados, como será comentado posteriormente, utilizando-se o programa *Primer Premier 5.0*<sup>40</sup>, foi desenhado um *primer* BabI (5'- CGT GGC TGA AAT GGT GGA - 3') dirigido para a região que está deletada na *B. abortus*, mas que está presente nas outras espécies. Este terceiro *primer* foi desenhado com a finalidade de sempre se conseguir a amplificação de um fragmento, tanto no caso de se ter um isolado de *B. abortus* quanto de se ter um isolado de qualquer outra espécie.

Espera-se que este *primer* BabI atue em conjunto com o *primer* anti-senso (BabAS), e produza nas outras espécies, exceto *B. abortus*, a amplificação de um fragmento, de tamanho diferente do esperado na *B. abortus* com os *primers* BabS e BabAS. Utilizando-se os três *primers* em conjunto, espera-se com os *primers* BabS e BabAS, a amplificação de 410pb para as cepas de *B. abortus*, e com os *primers* BabI e BabAS a amplificação de fragmentos variando de 856 a 857pb de todas as outras espécies, exceto a *B. abortus*, como demonstrado na Figura 4.

<sup>40</sup>Produced by Primer Premier, PREMIER Biosoft International, www.Premier Biosoft.com

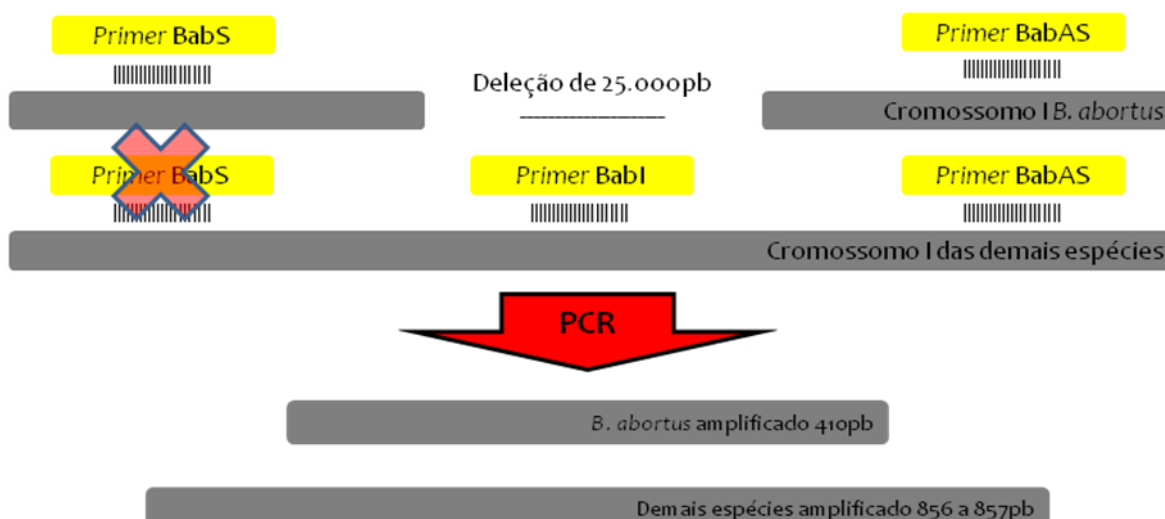


Figura 4 – Desenho esquemático da localização dos *primers* BabS, BabAS e BabI frente a deleção estudada de *B. abortus* e dos tamanhos dos amplificandos esperados

#### 6.8.5 Teste de especificidade dos primers BMEI<sup>1434F</sup>/BMEI<sup>1436R</sup> e BMEI<sup>1436F</sup>/BMEI<sup>1435R</sup> descritos na literatura para diferenciação de *B. canis*

Considerando-se, como será discutido a seguir, que não foram obtidos os resultados esperados para diferenciação de *B. canis* com os *primers* BcanS e BcanAS, e que o desenho destes foi baseado em uma deleção já descrita na literatura e confirmada por outros autores, decidiu-se testar os dois pares *primers* descritos, o BMEI<sup>1434F</sup> (5'-GCC AGC CAC AGG ATC AGG TGA T -3') e BMEI<sup>1436R</sup> (5'-GGA TCC GTT CGT TTC GCT CG -3') por Rajashekara et al. (2004), e o BMEI<sup>1436F</sup> (5'-ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT -3') e BMEI<sup>1435R</sup> (5'-TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC -3') por López-Goñi et al. (2008), em nossas amostras de referência e isolados de campo de *B. canis* para verificar o funcionamento dos mesmos e determinar a existência de algum defeito nos *primers* que desenhamos.

A Figura 5 é uma representação esquemática da localização dos três pares de *primers* frente à deleção estudada na *B. canis*. Os *primers* desenhados por Rajashekara et al. (2004), da mesma maneira que o nosso, flanqueavam a deleção na *B. canis* e espera-se com estes a amplificação de um fragmento de 607pb da *B. canis* e um fragmento maior variando de 1539 a 1674pb para as demais espécies. Quanto aos *primers* desenhados por López-Goñi et al. (2008), verifica-se que o

*primer reverse* está localizado na região deletada da *B. canis*, assim não espera-se amplificação para *B. canis* e das demais espécies espera-se a amplificação de um fragmento variando de 794 a 813pb dependendo da espécie.

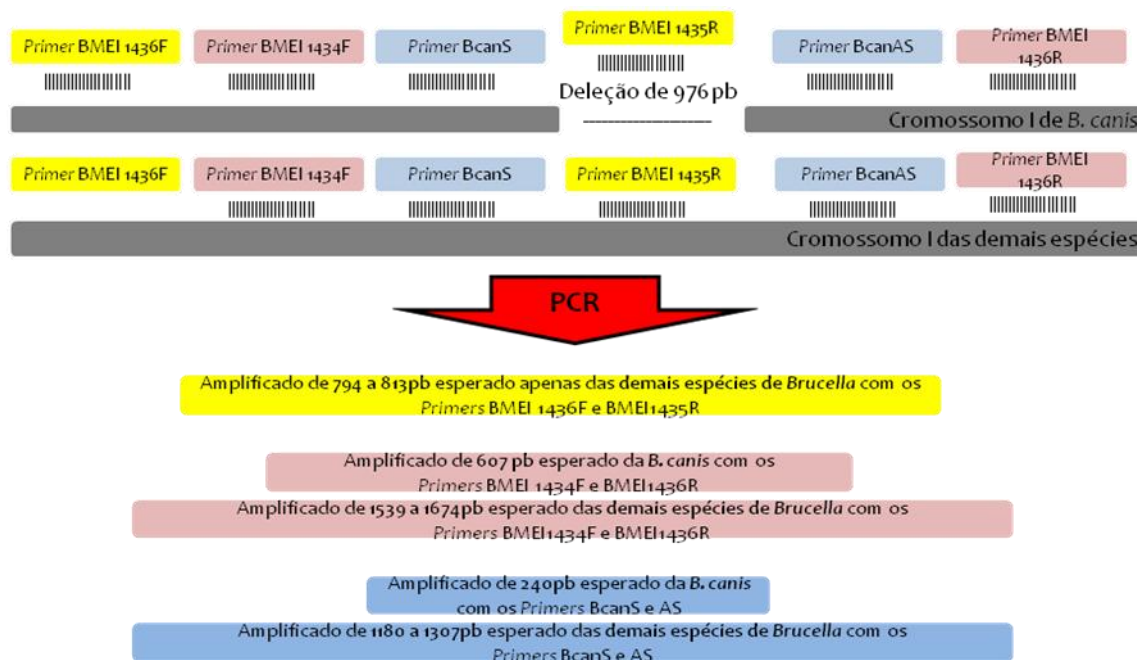


Figura 5 – Desenho esquemático da localização dos pares primers BMEI<sub>1434F</sub>/BMEI<sub>1436R</sub>, BMEI<sub>1436F</sub>/BMEI<sub>1435R</sub> e BcanS/BcanAS frente a deleção estudada da *B. canis*

### 5.9 Alinhamento múltiplo das sequências do cromossomo I e II de *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis* e *B. canis*

Já que não foram obtidos os resultados esperados com os primers desenhados baseados nos polimorfismos descritos na literatura, exceto para a *B. abortus*, com a finalidade de promover uma ampla comparação entre os genomas das espécies de *Brucella*, e poder analisar simultaneamente os eventos de deleções, inserções, mutações, e sequências repetitivas (microsatélites) ou qualquer outro evento de polimorfismo que ocorra entre as espécies, foi realizado o alinhamento múltiplo, das sequências do cromossomo I e II de *Brucella* que estavam disponíveis no GenBank até setembro de 2009 (Quadro 4), que permitiu a comparação das sequências alinhadas, facilitando assim o reconhecimento das

regiões polimórficas únicas de cada espécie e o desenho de *primers* espécie-específicos.

Espécies de <i>Brucella</i>	Referência do GenBank	
	Cromossomo I	Cromossomo II
<i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus 2308	gi 82698932 ref NC_007618.1	gi 83268957 ref NC_007624.1
<i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941	gi 62288991 ref NC_006932.1	gi 62316961 ref NC_006933.1
<i>Brucella abortus</i> S19	gi 189023268 ref NC_010742.1	gi 189022234 ref NC_010740.1
<i>Brucella canis</i> ATCC 23365	gi 161334802 gb CP000872.1	gi 161336905 gb CP000873.1
<i>Brucella melitensis</i> 16M	gi 17986284 ref NC_003317.1	NR
<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457	NR	gi 225641976 gb CP001489.1
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840	gi 148370077 gb CP000708.1	gi 148369114 gb CP000709.1
<i>Brucella suis</i> 1330	gi 56968325 ref NC_004310.3	gi 56968493 ref NC_004311.2
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445	gi 163673000 gb CP000911.1	NR
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445	gi 163842277 ref NC_010169.1	NR
<i>Brucella microti</i> CCM 4915	NR	gi 255997455 gb CP001579.1

NR – Sequências não incluídas no alinhamento

Quadro 4 – Sequências de referência do cromossomo I e II de *Brucella* disponíveis no GenBank até setembro de 2009 e que foram utilizadas no alinhamento múltiplo, e seu respectivo número de acesso no GenBank

Para tal alinhamento, foi utilizado o programa Kalign (LASSMANN; SONNHAMMER, 2005), um algoritmo de alinhamento múltiplo hierárquico, cujo processo de alinhamento não utiliza toda memória RAM, como em outros programas testados, MUSCLE (EDGAR, 2004), CLUSTAL (JEANMOUGIN et al., 1994) e T-coffee (NOTREDAME, 2000), permitindo o alinhamento de sequências grandes como dos cromossomos da *Brucella*.

O alinhamento foi realizado em sistema operacional Linux, em um computador com 18 processadores clusterizados e com 16GB de memória. Ao final de quase duas semanas, o programa disponibilizou o alinhamento das sequências, em formato *fasta*, totalizando 2.270.860 nucleotídeos alinhados no cromossomo I e 1.290.050 nucleotídeos no cromossomo II.

As diferenças entre as sequências foram manualmente pesquisadas no programa Bioedit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999), O cromossomo I já foi inteiramente analisado e as diferenças encontradas foram catalogadas, e posteriormente, confirmadas no banco de dados não redundante do NCBI através de BLASTn<sup>41</sup> (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando-se os parâmetros de *default*, exceto para Word size: 32; Mismatch/Match: -2/1; GAP: -5 existence, -2 extension, visando assim

<sup>41</sup> BLASTn Aplicativo disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 2010.

aumentar a especificidade da busca e retornar as sequências mais relacionadas a família *Brucellaceae*.

As diferenças encontradas para as diversas espécies foram todas catalogadas, exceto para *B. ovis*, que apresentou um número muito superior de polimorfismos quando comparado as quatro outras espécies, possivelmente devido a existência de um número elevado de pseudogenes e elementos móveis ou transpostos, como observado também por Tsolis et al. (2009). Assim para esta espécie apenas os polimorfismos mais importantes e significativos foram considerados para análise.

A *B. suis* não apresentou regiões polimórficas exclusivas, sendo todos os polimorfismos encontrados nesta espécie eram partilhados com a *B. canis*, o que acreditamos que se deva a proximidade filogenética destas espécies (FOSTER et al., 2009).

Após analisadas e confirmadas por BLASTn, todas sequências polimórficas foram submetidas a BLASTx e tBLASTx<sup>42</sup>, para verificação da função biológica nas regiões polimórficas estabelecidas e dentre elas, foram escolhidas para desenho de *primers* apenas as sequências com função conhecida (contidas em um gene conhecido) e conservada, pois estas sofrem maior pressão seletiva comparada a outras, como regiões inter-gênicas. Acredita-se que seria mais fácil conseguir marcadores estáveis para estas regiões codificadoras de proteínas. Nessa abordagem, foram descartadas as regiões cujo resultado foi de proteínas hipotéticas e regiões de função ainda não descrita.

Segundo os polimorfismos encontrados no alinhamento múltiplo, foram desenhados com o programa *PerlPrimer* (MARSHALL, 2004), dois pares de *primers* para *B. canis*, *B. ovis* e *B. melitensis*, sendo um dirigido a uma sequência polimórfica única da espécie, que geraria apenas um *amplicon* do tamanho esperado para espécie, e o outro par de *primer*, ancorado na sequência comum de todas as espécies que flanqueia a região polimórfica, o qual geraria dois *amplicons* de tamanhos diferentes, que diferenciam a espécie em análise das demais pelo tamanho do fragmento gerado, como demonstrado na Figura 6.

---

<sup>42</sup> BLASTx e tBLASTx Aplicativo disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 2010.

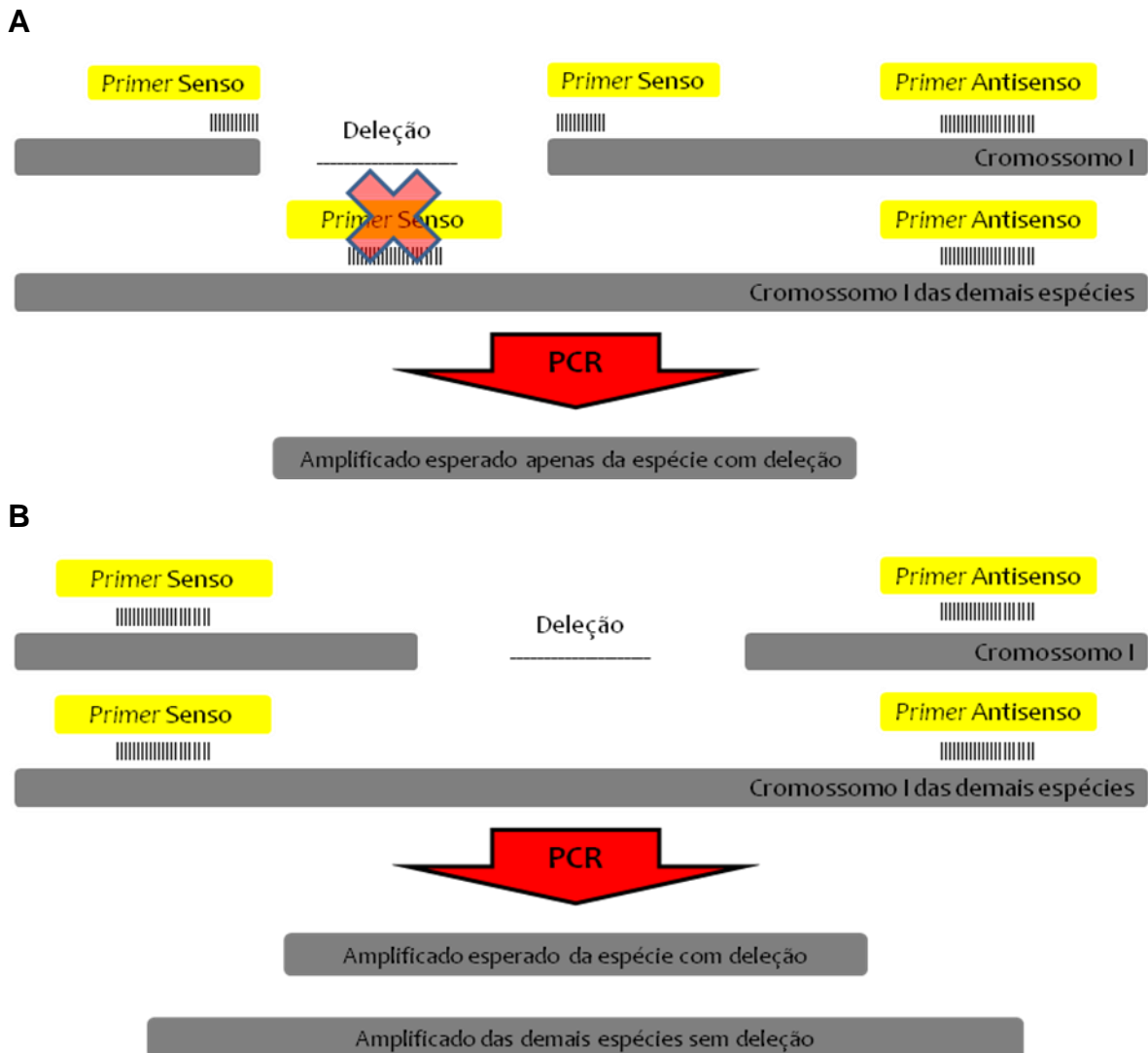


Figura 6 – Desenho esquemático de *primers* dirigido a uma sequência polimórfica única da espécie, gerando apenas um *amplicon* do tamanho esperado para espécie em análise (A), e de *primer* ancorado na sequência comum de todas as espécies que flaqueia a região polimórfica, o qual geraria dois *amplicons* de tamanhos diferentes, que diferenciam a espécie em análise das demais pelo tamanho do fragmento gerado (B)

Essa abordagem foi realizada para todas as espécies alinhadas exceto para *B. suis*, cujos polimorfismos encontrados não eram exclusivos, sendo partilhados com *B. canis*, deste modo foi desenhado um par de *primers* para uma sequência considerada única das *B. canis* e *B. suis*, a qual se mostrou capaz de diferenciar estas duas espécies das demais.

Segundo os polimorfismos encontrados foram desenhados dois pares de *primers* para diferenciação de *B. canis*, um direcionado a deleção de 357pb relacionado à síntese da proteína capsular CapD, denominado Bcan<sub>CapDF</sub> (5'- TTT

CAT GTC CAT CAA GGA GGC -3') e Bcan<sub>CapDR</sub> (5'- CAA CTT CAT GGAT GGT CTC G -3'), cujos fragmentos de amplificação esperados são de 596pb para *B. canis* e 954pb para as demais espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis*, como demonstrado na Figura 7.

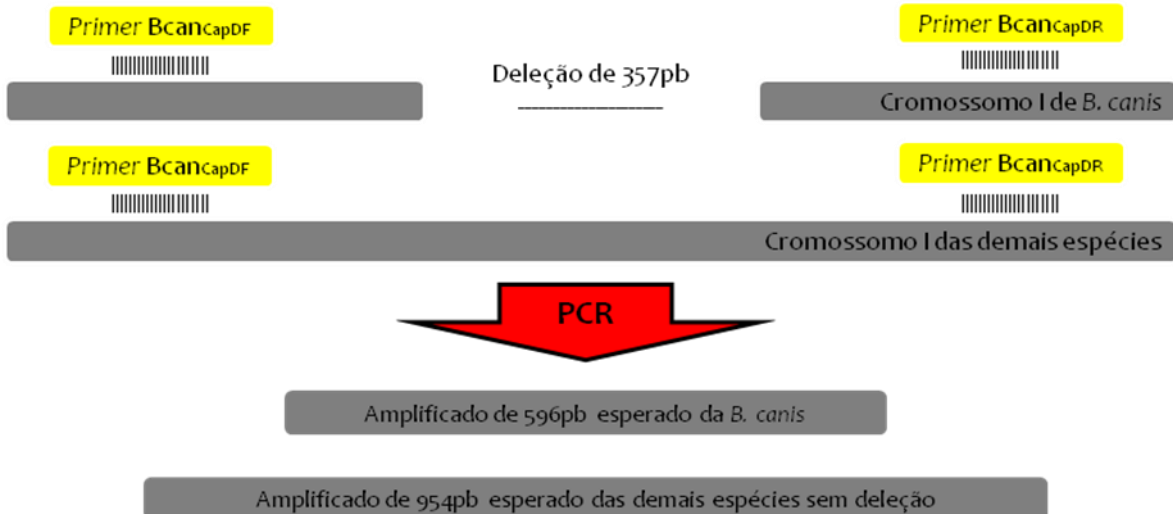


Figura 7 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bcan<sub>CapDF</sub> e Bcan<sub>CapDR</sub> frente a deleção estudada de *B. canis* e dos tamanhos dos amplificados esperados

O segundo par foi direcionado a deleção de 296pb desta espécie relacionado à síntese de uma acetiltransferase, denominado Bcan<sub>AcetF</sub> (5'- TCG ATT GGC TCA TCA TCG TC -3') e Bcan<sub>AcetR</sub> (5'- TAC TTT AGC GGC CTA GAG GAG -3'), cujo fragmento de amplificação esperado é de 318pb, apenas para *B. canis* (Figura 8).

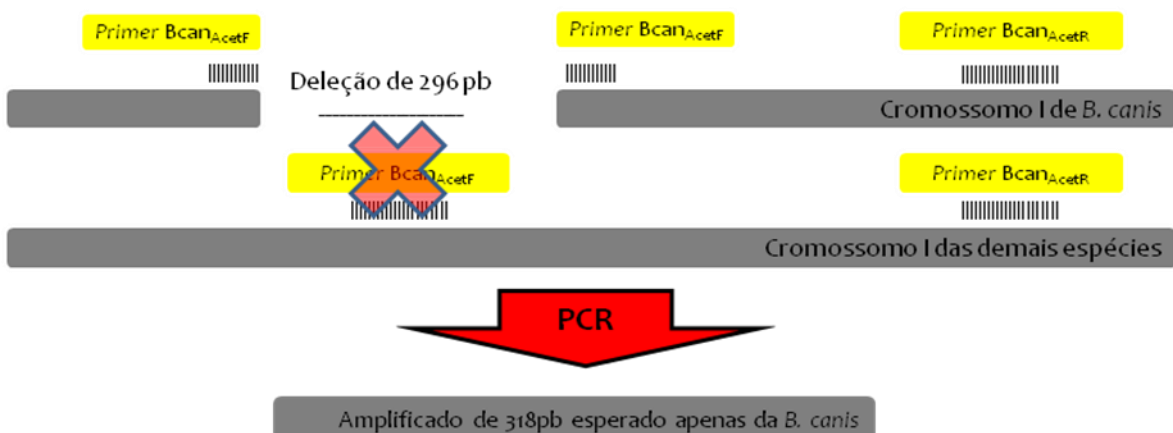
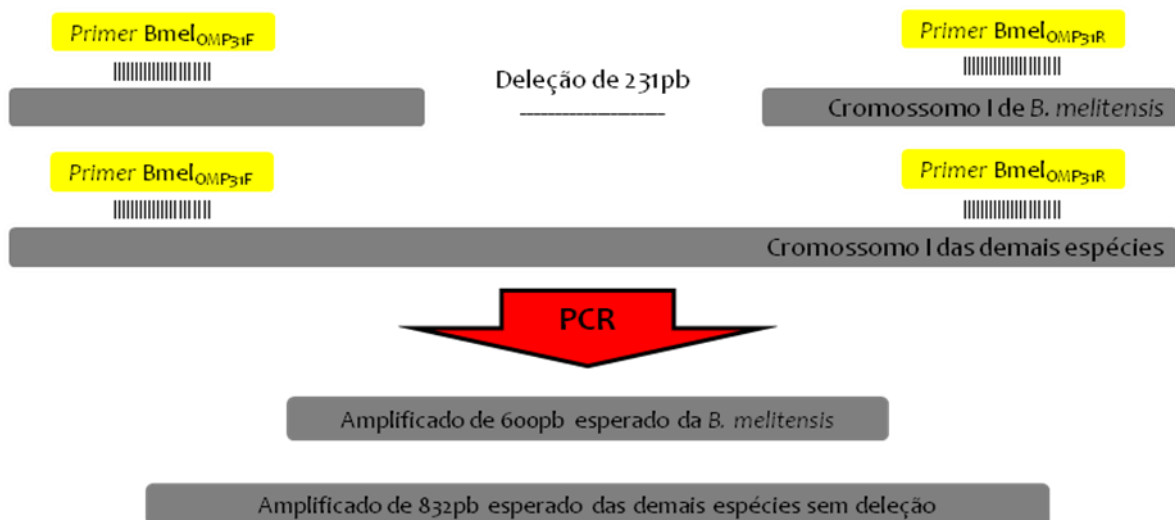


Figura 8 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bcan<sub>AcetF</sub> e Bcan<sub>AcetR</sub> frente a deleção estudada de *B. canis* e do tamanho do amplificado esperado

Para diferenciação de *B. melitensis* foram desenhados dois pares de *primers*, um direcionado a uma deleção de 231pb desta espécie relacionada ao *Omp31b*, denominado Bmel<sub>Omp31F</sub> (5'- GCA ATA TAG TGA CAG ACA TTG G -3') e Bmel<sub>Omp31R</sub> (5'- AAC TTG TAG TTC AGA CCG AG -3'), cujos fragmentos de amplificação esperados são 600pb para *B. melitensis* e 832pb para as demais espécies *B. canis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* e *B. microti* (Figura 9).



**Figura 9 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bmel<sub>Omp31F</sub> e Bmel<sub>Omp31R</sub> frente a deleção estudada de *B. melitensis* e dos tamanhos dos amplificados esperados**

O segundo par de *primer* direcionado a deleção de 110pb, relacionada a uma acetil-CoA, denominado Bmel<sub>CoAF</sub> (5'- CAT GCC AAG CGA AGT TTC C -3') e Bmel<sub>CoAR</sub> (5'- GCG GCT TTG TCG ATA TTA CC -3'), cujos fragmentos de amplificação esperados são 714-5pb para *B. melitensis*, 821pb para *B. canis* e 825pb para as demais espécies *B. microti*, *B. ovis*, *B. suis* e *B. abortus* (Figura 10).



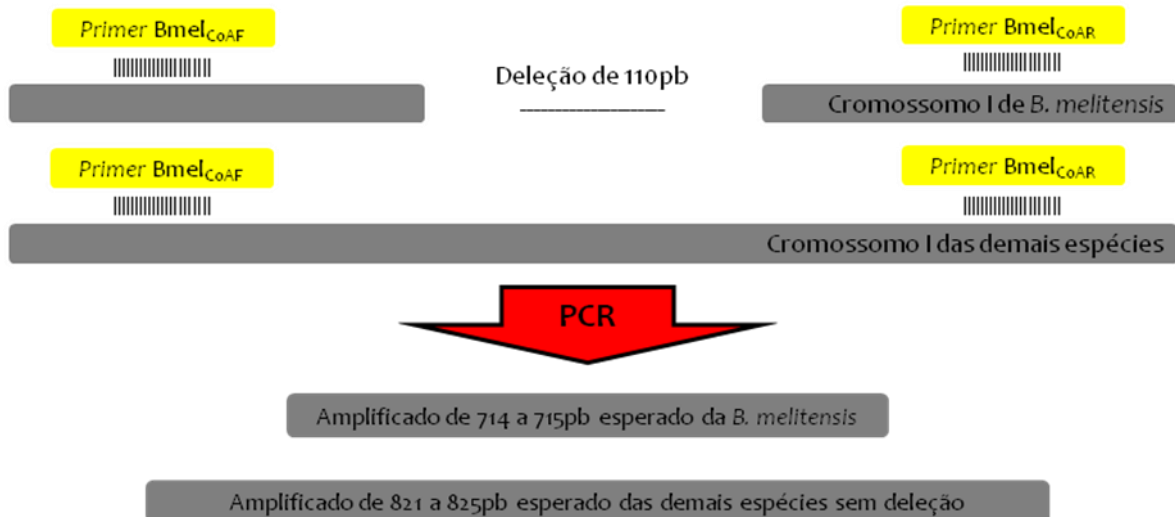


Figura 10 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bmel<sub>CoAF</sub> e Bmel<sub>CoAR</sub> frente a deleção estudada de *B. melitensis* e dos tamanhos dos amplificadores esperados

Para diferenciação de *B. ovis* também foram desenhados dois pares de *primers*, um direcionado a uma mutação de 21pb da espécie relacionada a uma *Omp*, denominado Bov<sub>OmpF</sub> (5'- GTT TGG ATT GTC TGT AAA CCA CG -3') e Bov<sub>OmpR</sub> (5'- CAC CAG AAT GGT AAC ATC TTT GG -3'), cujo fragmento de amplificação esperado é 583pb, apenas para *B. ovis* (Figura 11).

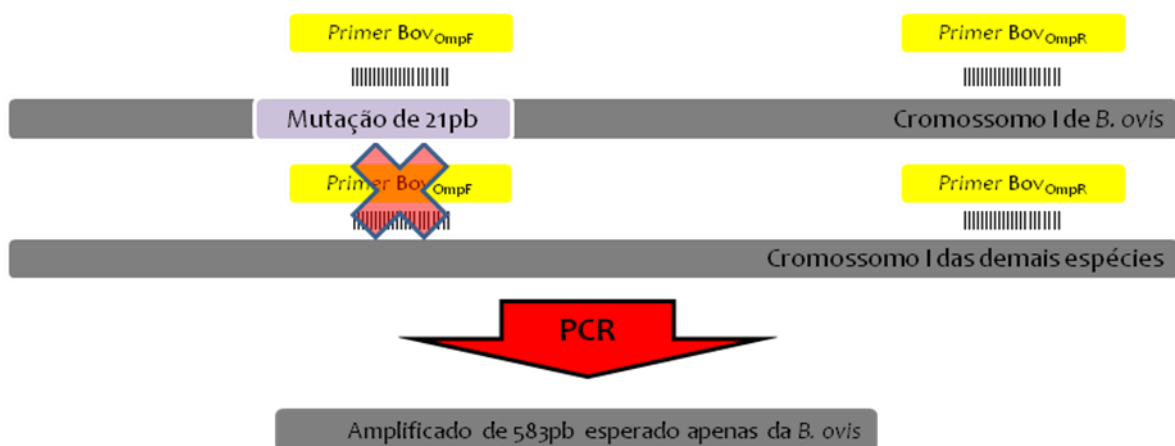


Figura 11 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bov<sub>OmpF</sub> e Bov<sub>OmpR</sub> frente a mutação estudada de *B. ovis* e do tamanho do amplificador esperado

O segundo par é direcionado a deleção de 263pb desta espécie (Figura 12), relacionada a um sistema transportador de sulfato ABC, denominado  $BoV_{TABCf}$  (5'-TTG GCT GAT GAC AAG GTG G -3') e  $BoV_{TABCr}$  (5'-GGG CGG TAG AAA TGT TTG G -3'), cujos fragmentos de amplificação esperados são 631pb para *B. ovis*, 895pb para a *B. canis*, *B. microti*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*.

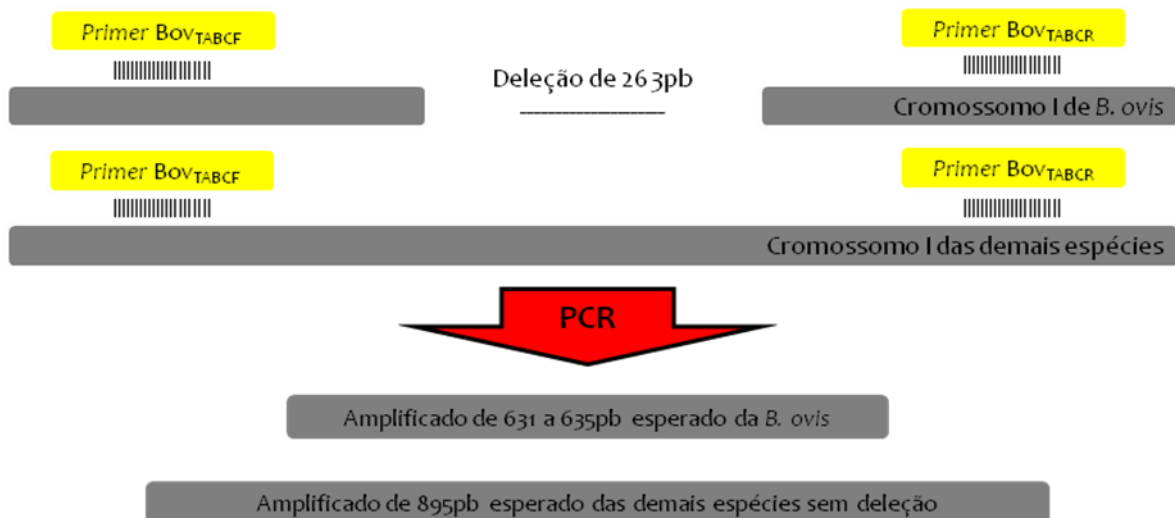


Figura 12 – Desenho esquemático da localização dos *primers*  $BoV_{TABCf}$  e  $BoV_{TABCr}$  frente a deleção estudada de *B. ovis* e dos tamanhos dos amplificadores esperados

Para diferenciação de *B. canis* / *B. suis* das demais espécies foi desenhado um par de *primers* direcionado a uma inserção de 10pb, relacionado a uma beta-lactamase, denominado  $Bcasu_{\beta-lacF}$  (5'-CTT GAC CGT ATC TTG ACC GT -3') e  $Bcasu_{\beta-lacR}$  (5'-GCA ATT CTG CTG AAG ATG CTC -3'), cujos fragmentos de amplificação esperados são 572pb para *B. suis* e *B. canis* (Figura 13) e fragmentos inespecíficos de 72pb para *Artemisa annua* e 136pb para *Oriza sativa*, completamente diferenciáveis dos fragmentos de interesse pelo tamanho dos amplificadores gerados que podem ser amplificados.

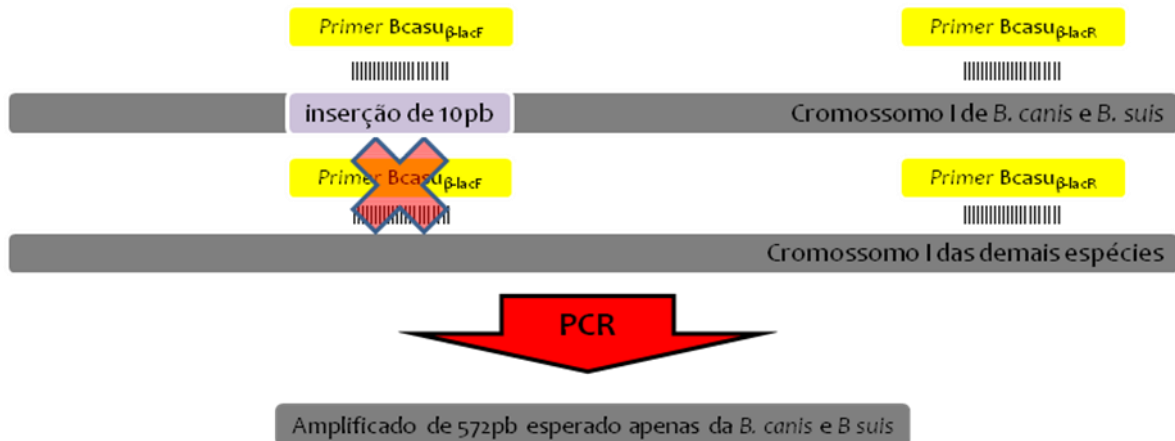


Figura 13 – Desenho esquemático da localização dos *primers* Bcasu $\beta$ -lacF e Bcasu $\beta$ -lacR frente a inserção estudada de *B. canis* e *B. suis* e do tamanho do amplificado esperado nestas espécies

### 5.10 Determinação da temperatura de anelamento ( $T_a$ °C) e condições de amplificação ótimas para os diferentes pares de *primers* desenhados

A temperatura de anelamento ( $T_a$ °C) ideal e as condições ótimas de amplificação da PCR foram determinadas para cada par de *primers* desenhado através de um gradiente de temperatura, utilizando-se como amostra padrão, em cada gradiente, a cepa de referência da espécie para qual o *primer* havia sido desenvolvido.

No gradiente utilizou-se um ciclo de PCR padronizado, composto por desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, repetição de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando entre  $\pm 5^\circ\text{C}$  da média da Temperatura de anelamento ( $T_a$ °C) dos dois *primers* senso e antisenso (informada pelo fabricante) por 30 segundos e extensão de 72°C por 45 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A reação de amplificação foi padronizada em um volume final de 50 $\mu\text{L}$  contendo 32,2 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura, 5 $\mu\text{L}$  de 10x PCR *Buffer* (Invitrogen); 2,5 $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1,5 $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 1,0 $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM) e 0,3 $\mu\text{L}$  de Platinum *TaqDNA* polimerase (Invitrogen) e 5 $\mu\text{L}$  de DNA da amostra.

Os resultados foram analisados e a temperatura mais alta onde a banda específica se apresentasse mais intensa e não ocorressem bandas inespecíficas foi escolhida.

### **5.11 Determinação da especificidade analítica das PCRs utilizando os *primers* desenhados**

A especificidade analítica das PCRs foi determinada para cada um dos pares de *primers* desenhados, com o DNA extraído de todas as espécies de referência de *Brucella* e posteriormente com os isolados de campo de *B. canis*, *B. abortus* e *B. suis*, sendo submetido à reação de PCR como descrito (no item 6.9) com  $T_a$ °C e condições de amplificação ótimas, determinadas para cada par de *primer*.

### **5.12 Análise dos produtos amplificados nas PCRs**

A análise dos produtos amplificados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA pH 8) com gel submetido a voltagem constante de 6-7 V/cm. O gel ficou imerso numa solução de brometo de etídio a 0,5µg/mL durante 20 minutos e foi observado em transluminador ultravioleta que possibilitou a visualização das bandas, que foram comparadas ao padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de tamanhos conhecidos que permitiu o reconhecimento dos fragmentos esperados.

## 5.13 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo protocolo de terminação de Sanger, conforme especificado abaixo.

### 5.13.1 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos das PCRs padronizadas foram purificados utilizando o kit de purificação ExoSAP – IT<sup>®</sup> *PCR Product Clean-up* (USB Corporation), pois resultavam, na sua maioria, em banda única. Dessa maneira, cerca de 3µL de ExoSAP – IT<sup>®</sup>, composto por Exonucleases I e Fosfatases alcalinas de camarão, foram adicionados diretamente a 7,5µL de produto da PCR para degradar *primers* e dNTPs que não foram consumidos na reação de PCR e, posteriormente, foi realizado tratamento a 37°C durante 15 minutos, seguido por incubação de 15 minutos a 80°C para inativar completamente as duas enzimas. Os produtos da PCR estavam, então, prontos para reações de sequenciamento.

### 5.13.2 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento utilizou-se o *kit* ABI PRISM<sup>™</sup> Big Dye Terminator<sup>™</sup> (Applied Biosystems) e para uma reação com 10µl de volume final, eram utilizados 2µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems<sup>™</sup>), 2µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems<sup>™</sup>), 10µL de cada *primer* (10pmol/µL) senso e antisenso em reações separadas e 20ng do DNA.

A reação de sequenciamento foi realizada sempre sob as seguintes condições, uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Em seguida as amostras foram mantidas a 4°C embrulhadas em folhas de alumínio até a sua precipitação.

### 5.13.3 Precipitação do DNA

Para precipitação adicionou-se a cada amostra 60µl de etanol a 100% e 5µl de EDTA 125mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente em local escuro. Em seguida foram centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta e em seguida adicionou-se 60µl de etanol a 75% (v/v em água). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. O etanol foi removido com a pipeta e as amostras foram colocadas em banho seco a 95°C por cerca de 5 minutos, para secagem completa dos microtubos e estes foram deixados no ambiente por mais de 5 minutos para impedir a formação de vapor dentro dos tubos. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do sequenciamento.

Antes de serem submetidas à eletroforese em sequenciador automático modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems, USA), as amostras foram homogeneizadas com 3,4µl de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95° por 3 minutos e colocadas no gelo por 2 min.

### 5.13.4 Edição de sequências

Os cromatogramas gerados a partir do sequenciamento, para as sequências senso e antisenso de cada *primer*, foram submetidos ao mesmo tratamento das sequências obtidas dos clones, como descrito no item 5.7.9.5.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

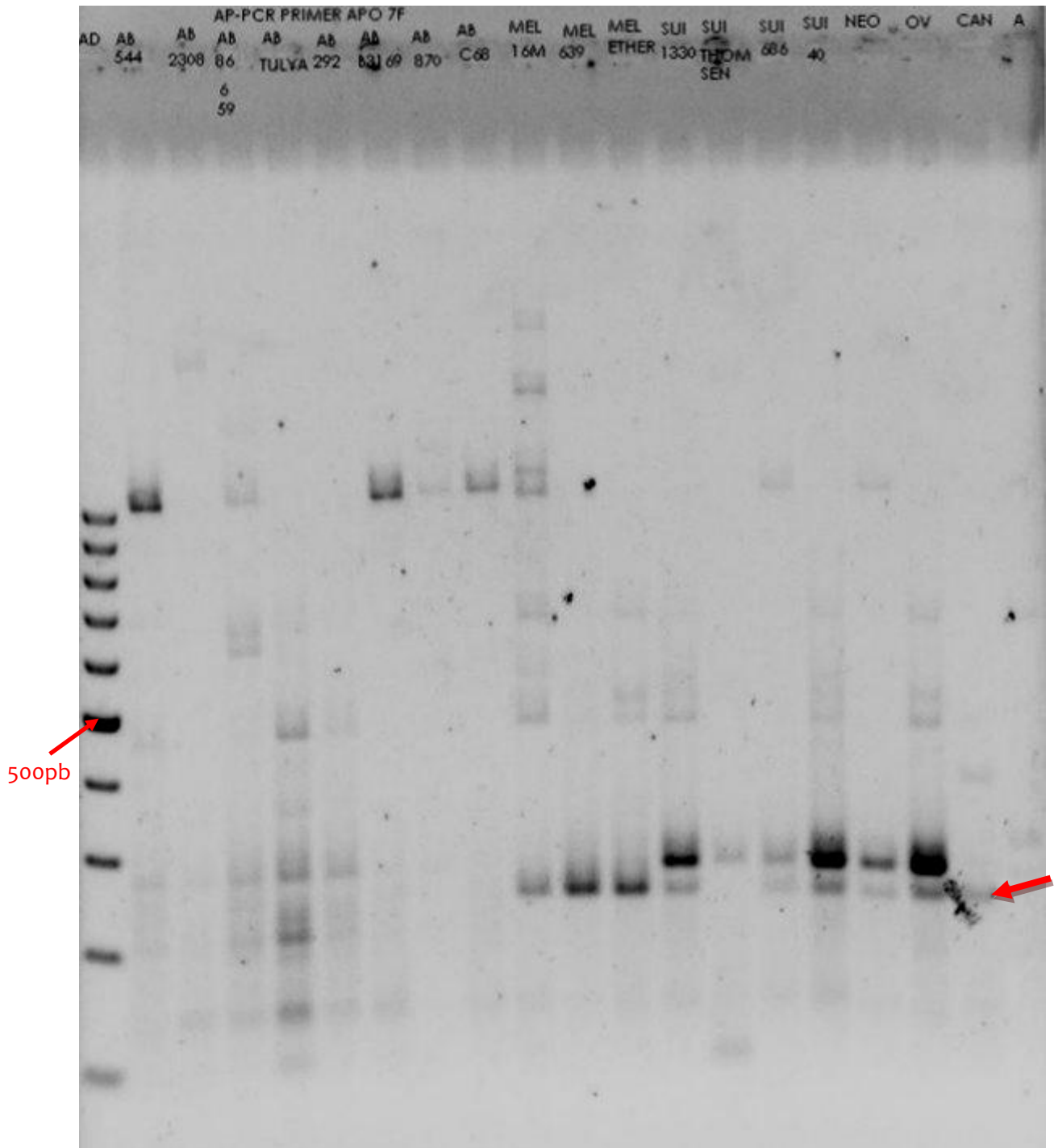
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns resultados discordantes do esperado foram obtidos no cultivo e identificação das amostras de referência de *Brucella*, dentre eles, todas as cepas apresentaram crescimento tanto quando cultivadas em aerobiose quanto em microaerofilia e isto poderia representar uma possível adaptação das cepas às condições laboratoriais de cultivo, além do que todas as cepas também apresentaram tempo de atividade ureásica mais lentos do que o esperado, e acredita-se que estes resultados estejam relacionados a quantidade de bactéria adicionada a reação, que pode ter sido inferior a esperada e aumentando o tempo de reação, entretanto nenhuma padronização desta quantidade é referida nos manuais que descrevem o isolamento da bactéria.

Adicionalmente, os biovars 1 e 2 de *B. suis* não apresentaram resultados positivos na prova de oxidase; os biovars 2 e 3 de *B. melitensis*, a cepa *B. canis* oriunda do RS e a cepa de *B. ovis* apresentaram produção de H<sub>2</sub>S; o biovar 1 de *B. abortus*, o biovar 1 de *B. melitensis* e a cepa de *B. canis* oriunda do RS não apresentaram redução de nitrato, e finalmente a cepa de *B. canis* oriunda do RS, reagiu como cepa de morfologia lisa nas provas da acriflavina e cristal de violeta, que parece ser a alteração mais preocupante visto que a morfologia rugosa é característica para as cepas desta espécie.

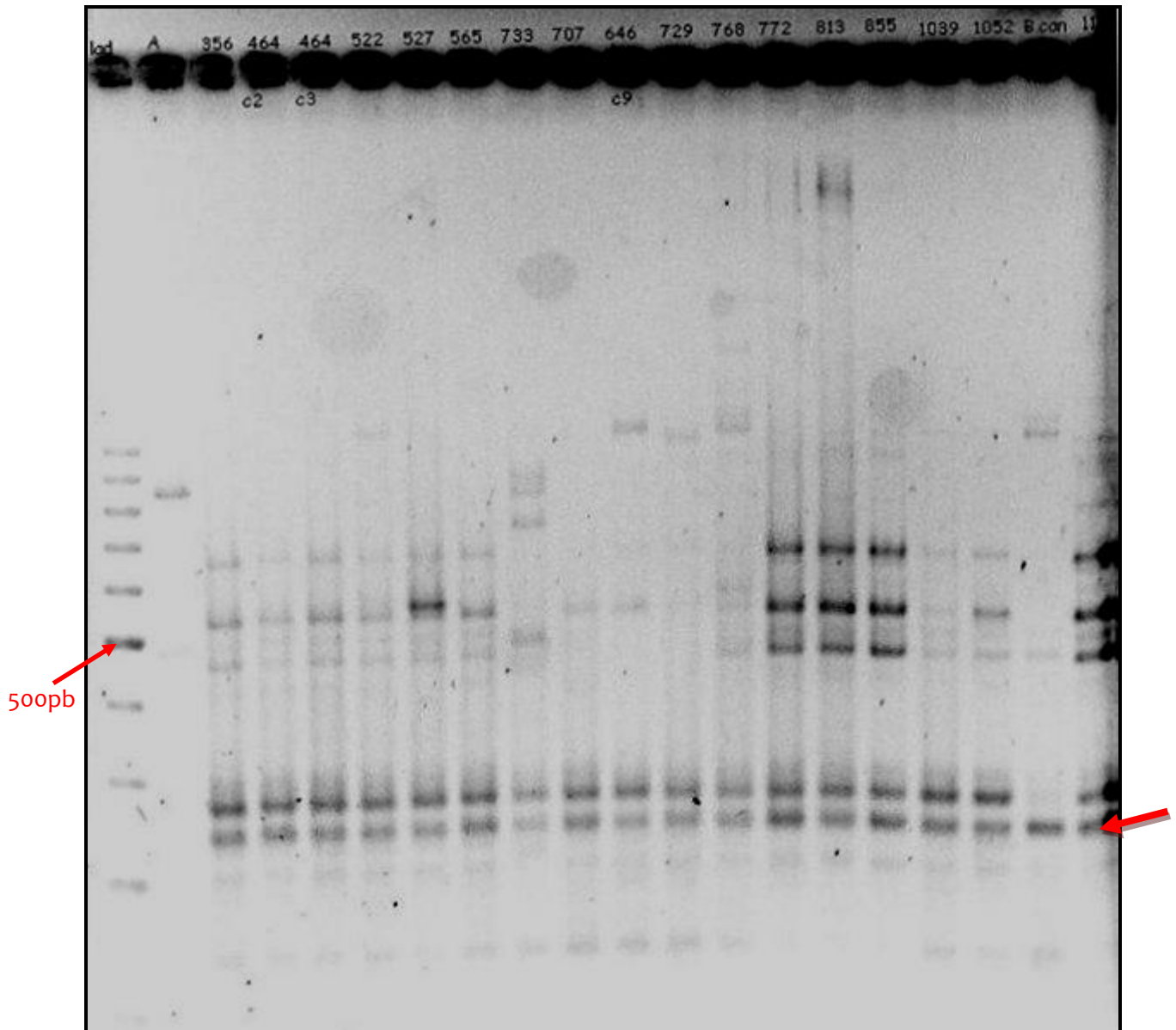
O resultado da AP-PCR, utilizando-se o *primer* APO<sub>7F</sub>, frente 18 cepas de referência de *Brucella* (Figura 14) e 19 isolados de campo de *B. canis* (Figura 15), revelou um *amplicon* de cerca de 250bp, representado pela seta vermelha, em todas as cepas isoladas de campo de *B. canis* e nas cepas de referência de *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis*, mas que não foi encontrado na *B. abortus*, e foi considerado um possível marcador para esta última espécie, visto que podia evidenciar uma deleção presente no genoma da *B. abortus*.





Lad- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; AB 544- *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; AB 2308- *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; AB 86/6/59- *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; AB TULYA- *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; AB 292- *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; AB B3169- *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; AB 870- *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; AB C68- *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; MEL 16M- *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; MEL 639- *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; MEL ETHER- *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; SUI 1330- *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; SUI THOMSEN- *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; SUI 686- *B. suis* biovar 3 estirpe 686; SUI 40- *B. suis* biovar 4 estirpe 40; NEO- *B. neotomae* estirpe 5K33; OV- *B. ovis* estirpe 63/290; CAN- *B. canis* estirpe RM6/66; A- controle negativo de amplificação;

**Figura 14 – Padrões de amplificação randômica obtidos dos diferentes biovars e espécies de *Brucella* utilizando-se o primer APO7F**

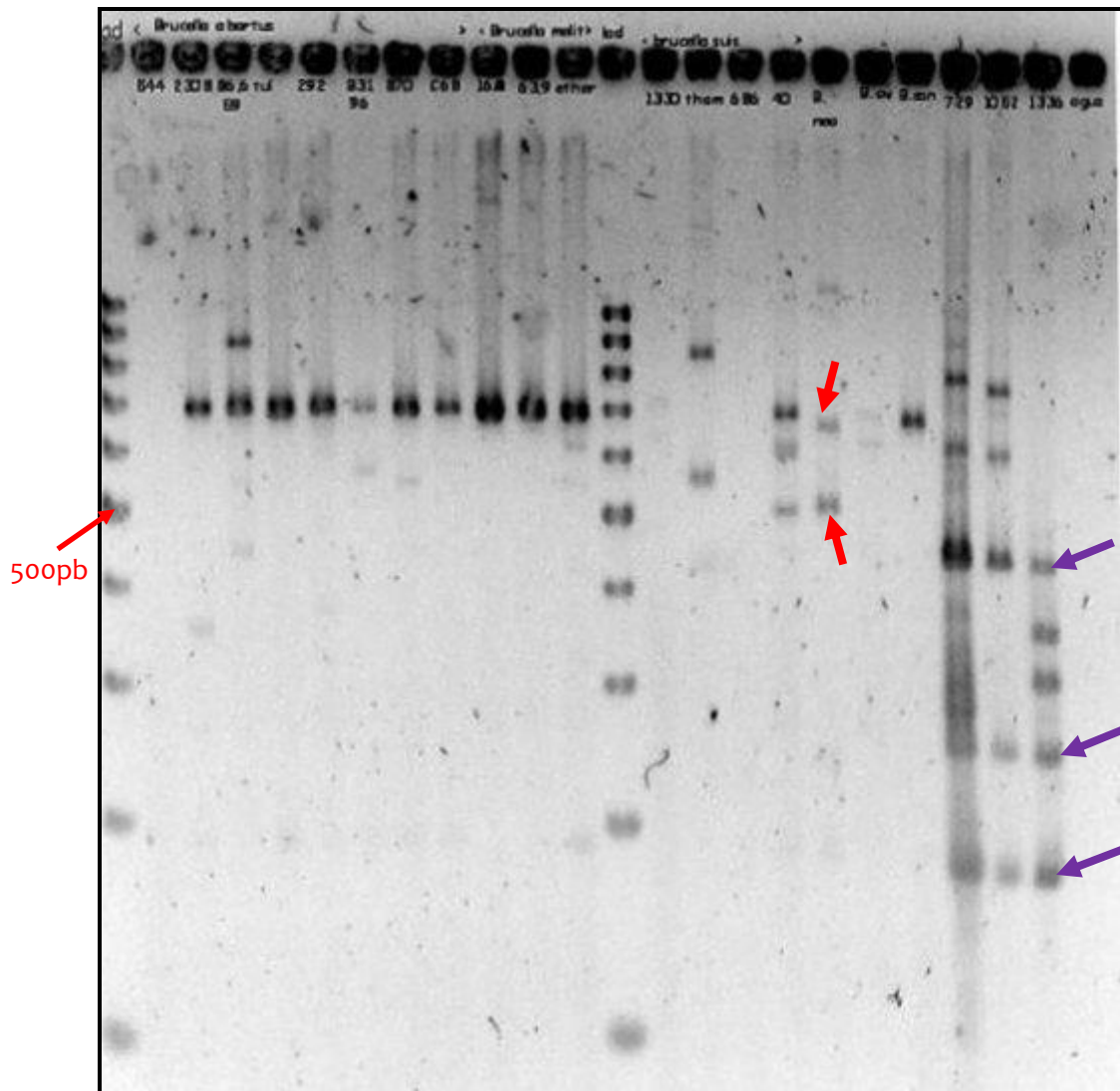


Lad- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; A- controle negativo de amplificação; 356- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 1; 464- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 2; 464- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 3; 522- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 4; 527- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 5; 565- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 6; 733- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 7; 707- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 8; 646- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 9; 729- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 10; 768- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 11; 772- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 12 e 4; 813- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 4; 855- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 13; 1039- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 14; 1052- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 15; B can- *B. canis* estirpe RM6/66; 11- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 16;

**Figura 15 – Padrões de amplificação randômica obtidos de 17 cepas de *Brucella canis* isoladas de campo oriundas de diferentes canis, utilizando-se o *primer APO7F***

Na RAPD com o *primer* OPLO<sub>4</sub> foi observada a amplificação de dois fragmentos na *B. neotomae* que não foram amplificados nas outras espécies (Figura 16), um com cerca de 500pb e outro cerca de 650bp, representados pela seta vermelha, que precisavam ser sequenciados para verificar se poderiam ser marcadores moleculares espécie-específicos.

Também com este *primer*, as três cepas isoladas de campo de *B. canis* apresentaram três bandas que não foram observadas nas demais espécies (Figura 16), uma com cerca de 150pb, outra em torno de 250 pb e a terceira com aproximadamente 450pb, representados pela seta roxa. Estes três fragmentos foram posteriormente sequenciados e analisados como clone 1, 2 e 3, respectivamente.



Lad- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 544- *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 2308- *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 86.6.59- *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; tul- *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 292- *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; B3196- *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 870- *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; C68- *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16M- *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 63.9- *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; ether- *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 1330- *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; thom- *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 686- *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 40- *B. suis* biovar 4 estirpe 40; Bneo- *B. neotomae* estirpe 5K33; Bov- *B. ovis* estirpe 63/290; Bcan- *B. canis* estirpe RM6/66; 729- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 10; 1052- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 15; 1336- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 17; Agua- controle negativo de amplificação;

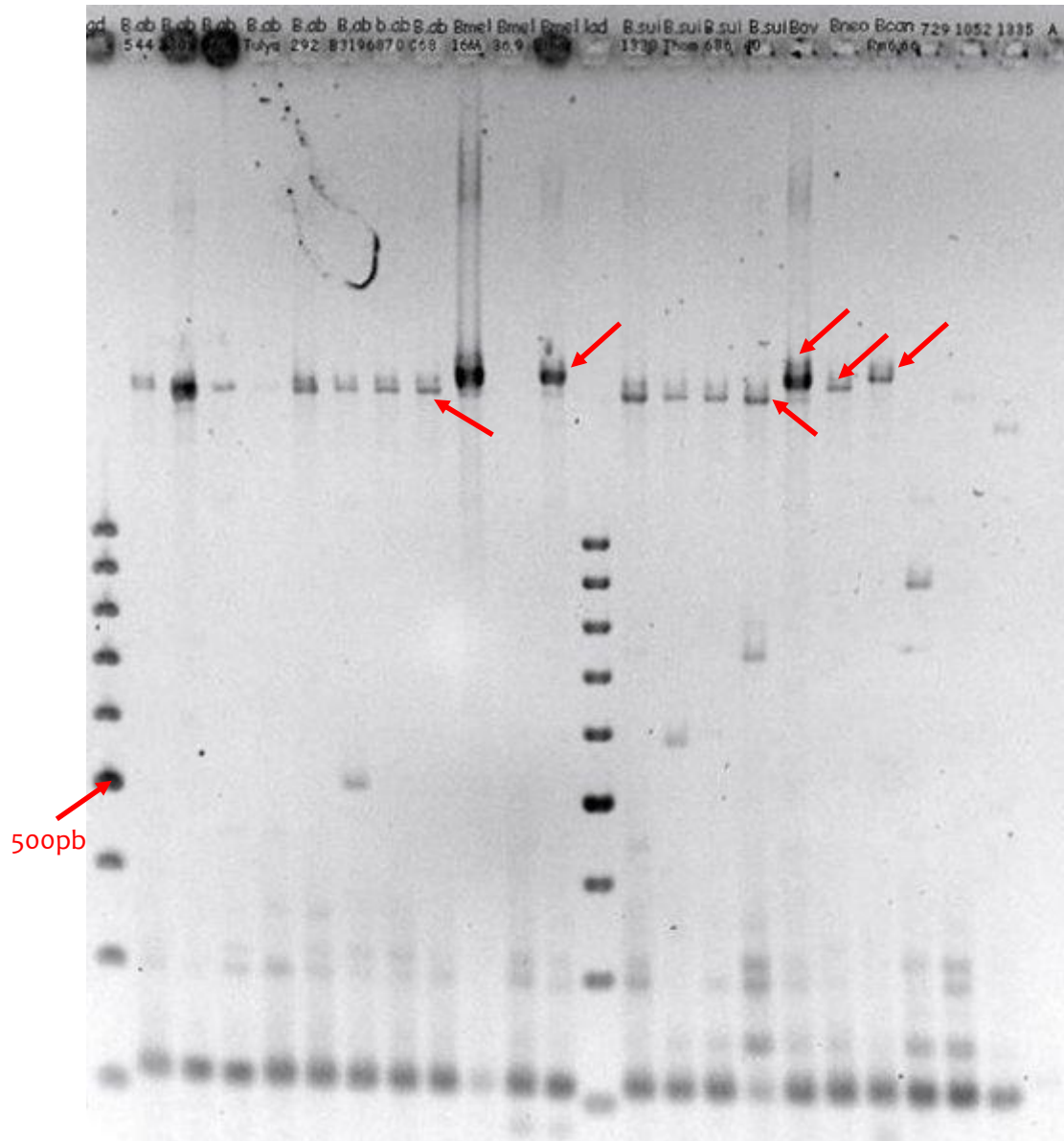
**Figura 16 – Padrões de amplificação randômica obtidos das espécies de referência de *Brucella* e de três cepas de *Brucella canis* isoladas de campo e oriundas de diferentes canis por RAPD utilizando-se o *primer* OPLO<sub>4</sub>**

Apesar destes fragmentos não terem sido encontrados na cepa de referência RM6/66, achamos importante realizar seu sequenciamento e verificar seu potencial como marcadores, uma vez que, diferentemente das cepas de campo, a cepa de referência RM6/66 vem sendo mantida em nosso laboratório há alguns anos e têm sido realizados repiques constantes visando à manutenção da mesma. Estes repiques poderiam ter provocado alguma substituição no DNA desta cepa, justificando a diferença encontrada entre ela e os isolados de campo.

A RAPD realizada com o *primer* P<sub>4</sub> (Figura 17) revelou a amplificação de fragmentos, que se diferenciam em tamanho dos amplificados das outras espécies, representados pelas setas vermelhas. Estes fragmentos de tamanhos diferentes entre espécies, mas que se mantinham nos biovares da mesma espécie, foram considerados possíveis marcadores moleculares espécie-específicos. O *amplicon* obtido da cepa de referência de *B. canis* foi depois analisado como clone 4.

Na RAPD realizada com o *primer* P<sub>5</sub> (Figura 18), a *B. ovis* apresentou dois fragmentos exclusivos, um maior do que 500pb e outro maior do que 600bp, representados pela seta vermelha, que foram posteriormente sequenciados para que pudessem ser caracterizados como possíveis marcadores moleculares desta espécie. Estes foram analisados, respectivamente, como clones 5 e 6. Há ainda um terceiro fragmento amplificado da *B. ovis*, com cerca de 500 pb, possivelmente sendo o mesmo apresentado pela *B. suis*, este foi considerado para análise como clone 7.

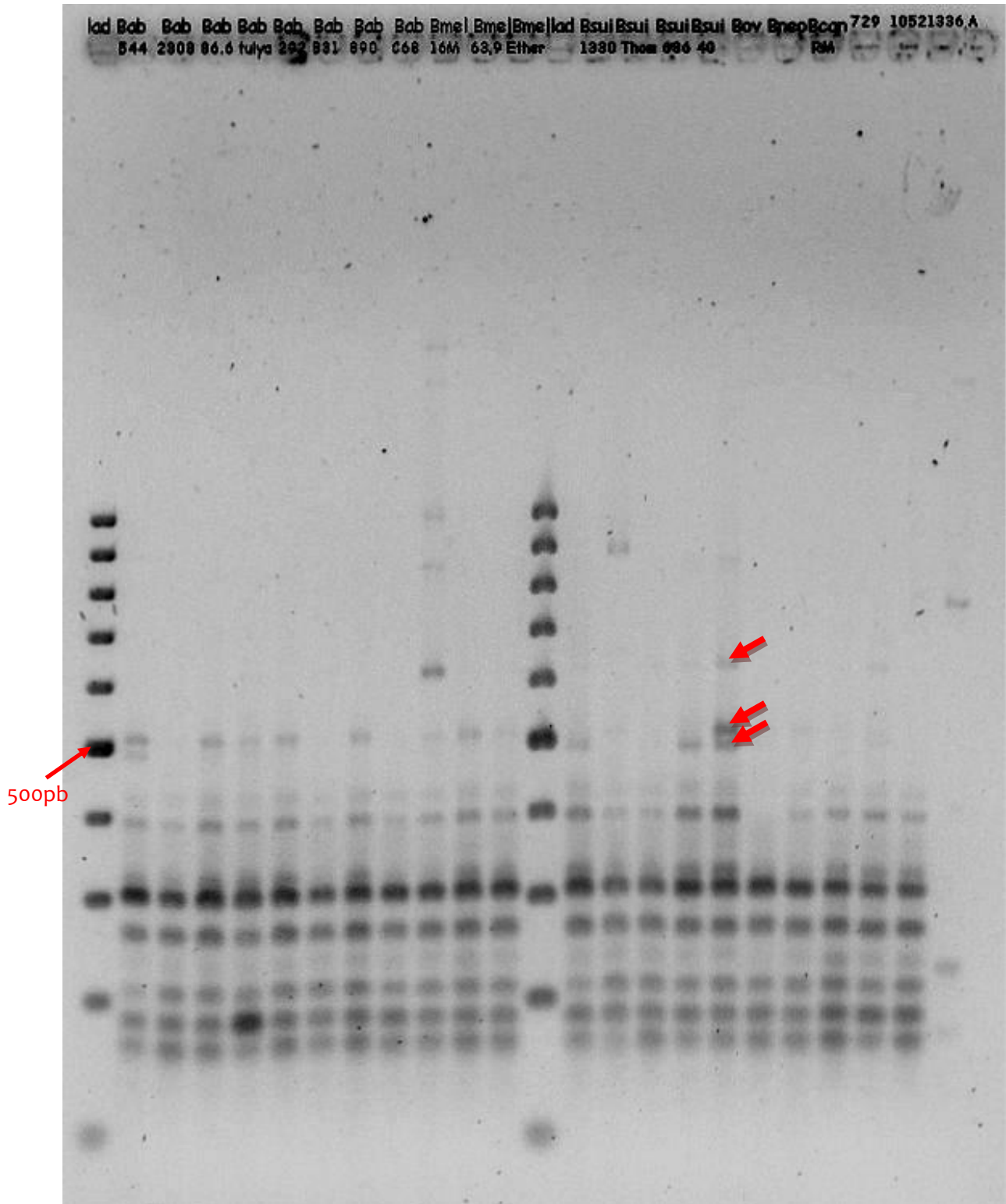
O resultado da RAPD realizada com o *primer* P<sub>3</sub> demonstrou padrões de bandas muito distintos entre as espécies e não se observaram bandas conservadas entre os biovares que pudessem ser consideradas possíveis marcadores para espécie.



Lad- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; Bab 544- *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; Bab 2308- *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; Bab 86.6- *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; Bab tulya- *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; Bab 292- *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; Bab B31- *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; Bab 890- *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; Bab C68- *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; B.mel 16M- *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; B.mel 63,9- *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; B.mel Ether- *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; Bsui 1330- *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; Bsui Thom- *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; Bsui 686- *B. suis* biovar 3 estirpe 686; Bsui 40- *B. suis* biovar 4 estirpe 40; Bov- *B. ovis* estirpe 63/290; Bneo- *B. neotomae* estirpe 5K33; BcanRM- *B. canis* estirpe RM6/66; 729- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 10; 1052- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 15; 1336- *B. canis* isolada de campo oriunda canil 17; A- controle negativo de amplificação;

**Figura 17 – Padrões de amplificação randômica obtidos por RAPD utilizando-se o primer P<sub>4</sub> e DNA das espécies de referência de *Brucella* e de três cepas de *Brucella canis* isoladas de campo e oriundas de canis diferentes**



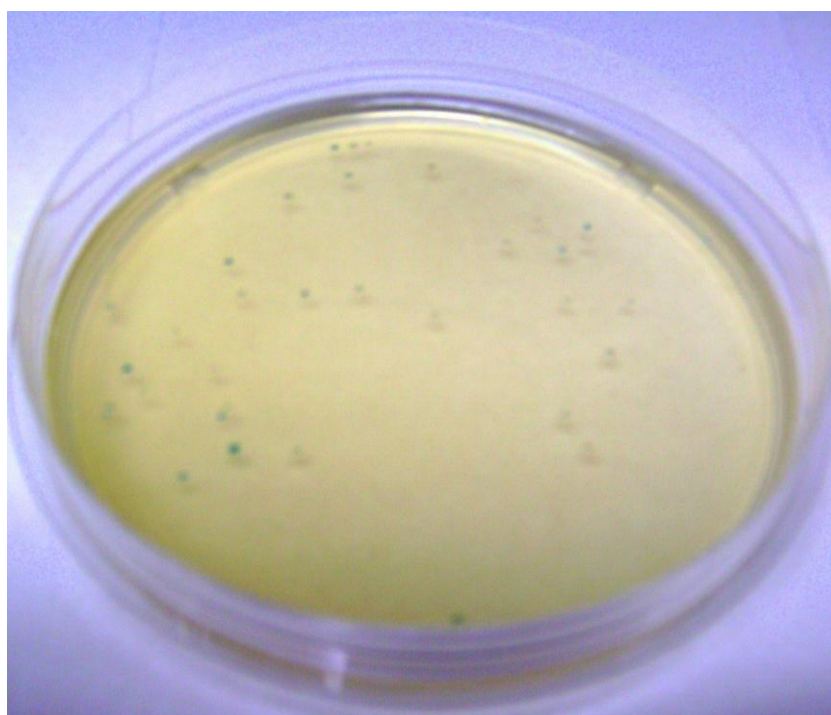


Lad– Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; Bab 544– *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; Bab 2308– *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; Bab 86.6– *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; Bab tulya– *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; Bab 292– *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; Bab B31– *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; Bab 890– *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; Bab C68– *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; B.mel 16M– *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; B.mel 63,9– *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; B.mel Ether– *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; Bsui 1330– *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; Bsui Thom– *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; Bsui 686– *B. suis* biovar 3 estirpe 686; Bsui 40– *B. suis* biovar 4 estirpe 40; Bov– *B. ovis* estirpe 63/290; Bneo– *B. neotomae* estirpe 5K33; BcanRM– *B. canis* estirpe RM6/66; 729– *B. canis* isolada de campo oriunda canil 10; 1052– *B. canis* isolada de campo oriunda canil 15; 1336– *B. canis* isolada de campo oriunda canil 17; A– controle negativo de amplificação;

**Figura 18 – Padrões de amplificação randômica obtidos das espécies de referência de *Brucella* e de três cepas de *Brucella canis* isoladas de campo e oriundas de canis diferentes por RAPD utilizando-se o primer P5**

No total foram obtidos 18 possíveis marcadores moleculares de polimorfismos, estes fragmentos considerados de interesse e que podiam representar possíveis marcadores moleculares, foram recortados do gel, purificados e inicialmente, sete foram clonados para posterior seqüenciamento, dentre eles os marcadores de polimorfismo para *B. canis* e *B. ovis*.

A Figura 19 contém colônias de *Escherichia coli* TOP10 transformadas (colônias brancas) e não transformadas (colônias azuis) cultivadas em meio LB contendo 50 µg/mL adicionado de IPTG e X-Gal para seleção das colônias transformantes, que foram obtidas através da clonagem dos fragmentos de interesse, depois submetidas à extração de DNA plasmidial e utilizadas como amostra numa PCR para obtenção do material de seqüenciamento.



**Figura 19 – Colônias transformadas (colônias brancas) e não transformadas (colônias azuis) de *Escherichia coli* TOP10 cultivadas em meio LB contendo 50 µg/mL adicionado de IPTG e X-Gal para seleção das colônias transformantes**

Do clone 1, obteve-se uma seqüência com 184pb, que no resultado da análise de similaridade por BLAST, resultou em uma proteína hipotética de função desconhecida (DUF1321), com identidades de 98 a 100% com as seqüências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

Uma sequência com 261pb foi obtida do clone 2. O resultado de similaridade revelou uma transponase hipotética, com identidades de 99 a 100% com as sequências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

Do clone 3, obteve-se uma sequência com 448pb, que no resultado da análise por similaridade, apresentou-se como uma desidrogenase hipotética com identidades de 97 a 100% com as sequências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

Obteve-se do clone 4 uma sequência com 543pb, cujo resultado da análise por similaridade apresentou-se como um receptor tipo Sel1 em algumas espécies e como uma proteína hipotética em outras, mas ambas revelaram identidades de 97 a 100% com as sequências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

Do clone 5, não obteve-se *contig*, visto que nenhum dos sequenciamentos realizados, gerou cromatogramas que pudessem ser utilizados, apresentando picos com escores de qualidade Phrap menor que 20.

Uma sequência com 293pb foi obtida do clone 6. O resultado da análise por similaridade apresentou uma dioxigenase em algumas espécies e como desidrogenase em outras, e revelou identidades de 99 a 100% com as sequências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

Obteve-se do clone-7, uma sequência com 490pb, cujo resultado da análise por similaridade apresentou-se como uma peptidase, que revelou identidades de 99% com as sequências de todas as espécies de *Brucella* disponíveis no GenBank.

A metodologia de clonagem dos fragmentos amplificados randomicamente foi abandonada quando tentativas de clonagem de novos fragmentos foram realizadas, sem sucesso, provavelmente por problemas na célula competente, recuperando um número reduzido de células transformadas na placa com IPTG e X-gal e não foi observado o fragmento de tamanho esperado na PCR com *primers* T<sub>3</sub> e T<sub>7</sub> ou M<sub>13f</sub> e M<sub>13R</sub>.

E adicionalmente, quando foram analisados os clones sequenciados (1 a 7), foi verificado que todos os clones testados como possíveis marcadores moleculares de *B. canis* ou *B. ovis*, na realidade não se mostraram marcadores moleculares destas espécies, uma vez que outras espécies de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* também apresentaram os mesmos fragmentos.



Assim, a metodologia foi considerada ineficiente na busca de marcadores moleculares espécie-específicos e decidiu-se continuar com a estratégia inicial proposta no trabalho de busca de marcadores moleculares baseados nos polimorfismos de DNA das espécies de *Brucella*.

Nesse sentido, começamos os testes com os *primers* desenhados para diferenciação das *B. canis* (BcanS e BcanAS), *B. ovis* (BovS e BovAS) e *B. abortus* (BabS e BabAS), depois de padronizadas as condições de reação para estes *primers*, a especificidade dos mesmos foi testada nas 18 cepas de referência de *Brucella*, 21 cepas de campo de *B. abortus*, e 30 cepas de campo de *B. canis*.

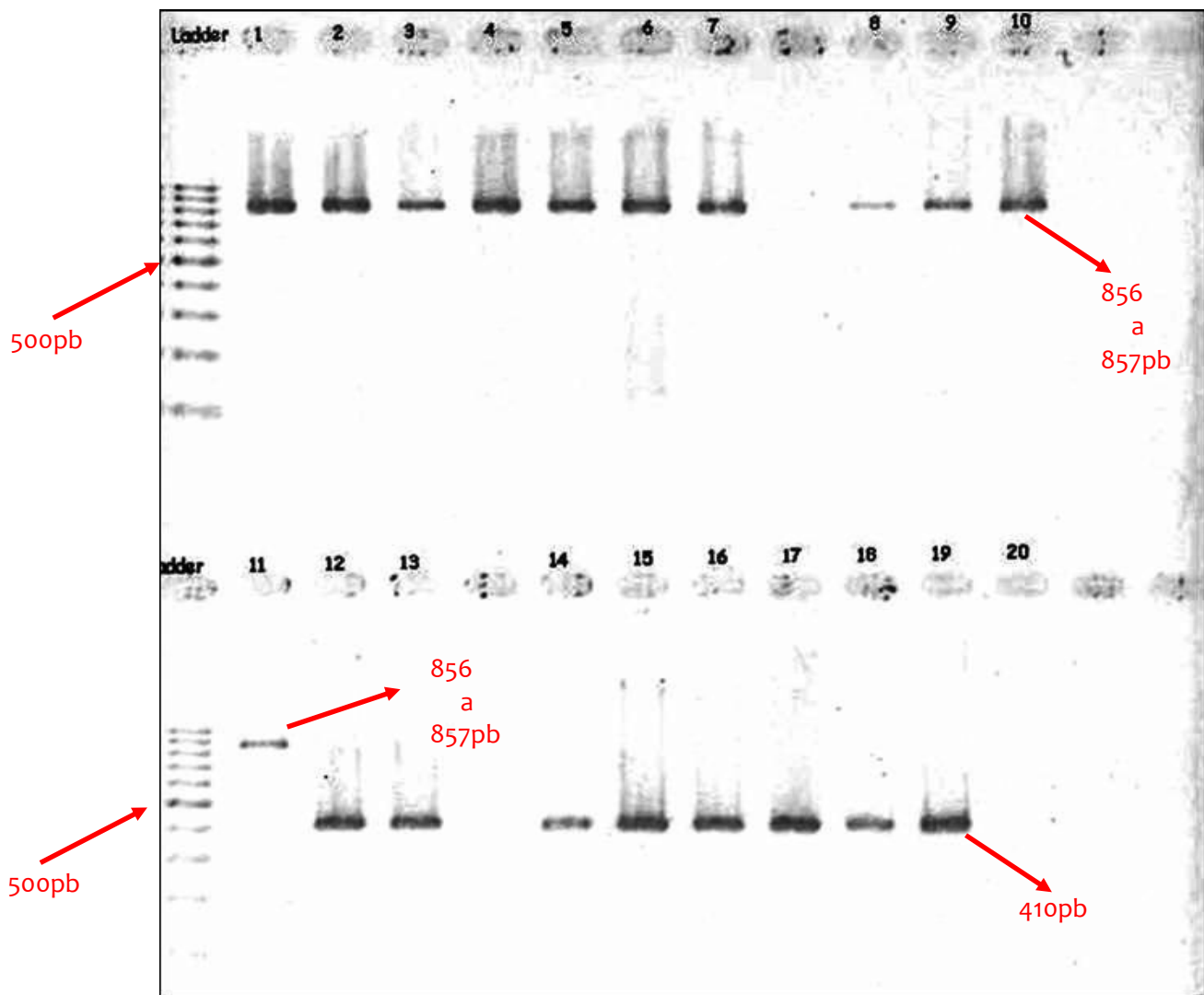
Dos *primers* testados para diferenciação da *B. canis*, *B. abortus* e *B. ovis*, somente o par de *primers* desenhado para *B. abortus* (BabS e BabAS) resultou em amplificação do fragmento esperado de 410pb apenas para os oito biovares das cepas de referência e 21 cepas de campo de *B. abortus*, não se verificando amplificação em nenhuma outra espécie de referência e nem nas amostras de *B. canis* isoladas de campo.

A análise de similaridade por BLAST do sequenciamento dos fragmentos de 410pb apresentados apenas pelas *B. abortus* revelaram identidade de 100% com apenas uma região do cromossomo II das *B. abortus* disponíveis no GenBank, ligada ao *omp31b*. Também houve similaridade destes com duas regiões diferentes do cromossomo II das demais espécies de *Brucella*, equidistantes cerca de 25.000pb, confirmando assim a existência da deleção na *B. abortus*.

Com estes resultados padronizou-se as condições de reação para o *primer* BabS, BabI e BabAS e a especificidade dos três *primers* utilizados em conjunto, também foi testada nas 18 cepas de referência de *Brucella*, 21 cepas de campo de *B. abortus*, e 30 cepas de campo de *B. canis*. Os testes demonstraram a amplificação dos fragmentos esperados, de 410pb para os oito biovares das cepas de referência e para as 21 cepas de campo de *B. abortus* e de 856-7pb das cepas de referência das demais espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae* e das 30 cepas campo de *B. canis* (Figura 20).

Os fragmentos de 856-7pb, obtidos das *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, a partir dos *primers* BabI e BabAS, também foram sequenciados e a análise de similaridade por BLAST revelou identidade de 100% com apenas uma região do cromossomo II das *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* e *B. ovis* disponíveis no GenBank, confirmando que esta sequência só é amplificada das outras *brucelas* que

não apresentam a deleção. Também houve similaridade com uma pequena região do genoma no cromossomo II das sequências de *B. abortus*, de cerca de 60pb, mas que correspondente a região comum presente em todas as espécies onde o *primer* BabAS foi ancorado.

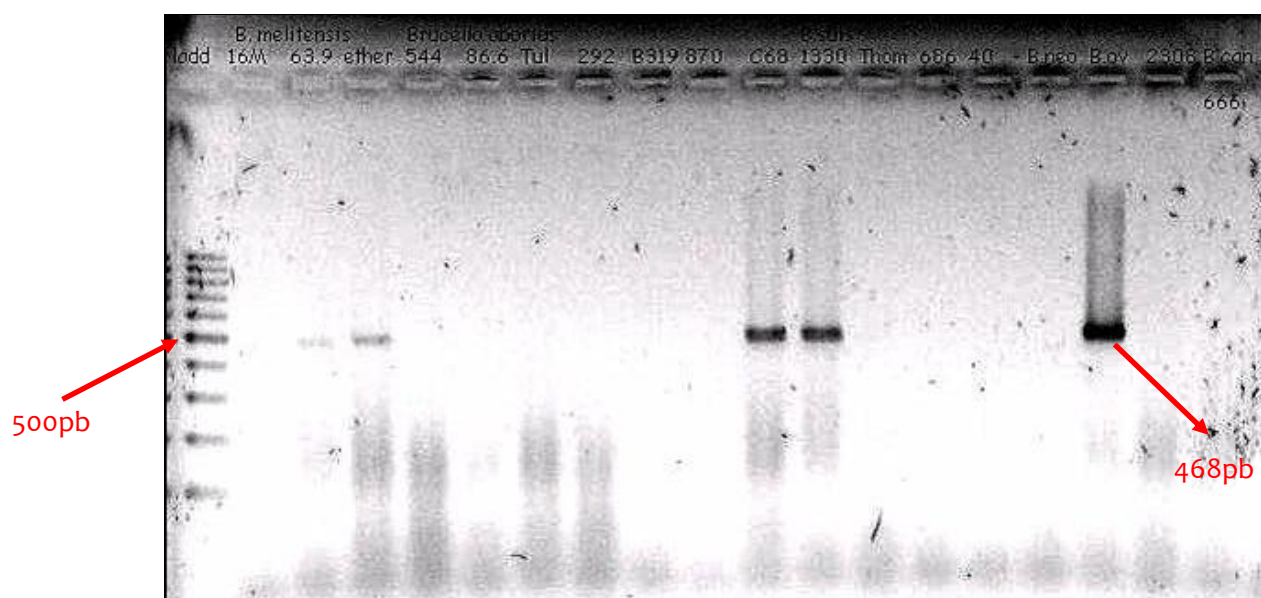


Ladder– Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 1– *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2– *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3– *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4– *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 5– *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 6– *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 7– *B. suis* biovar 4 estirpe 40; 8– *B. ovis* estirpe 63/290; 9– *B. canis* estirpe RM6/66; 10– *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 11– *B. neotomae* estirpe 5K33; 12– *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 13– *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 14– *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 15– *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 16– *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 17– *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 18– *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 19– *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 20– controle negativo de amplificação.

**Figura 20 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de 410pb para os oito biovars das cepas de referência de *B. abortus* e do fragmento de 856-7pb das cepas de referência das demais espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. neotomae*, quando utilizados em conjunto os *primers* BabS, BabI e BabAS**

Os *primers* específicos para *B. ovis* amplificaram o fragmento de 468pb, esperado apenas para esta espécie, também em outras espécies referência de

*Brucella*, como a *B. melitensis* bv. 2 estirpe 63/9, *B. melitensis* bv. 3 estirpe Ether, *B. abortus* bv 9 estirpe C68 e da *B. suis* bv. 1 estirpe 1330 (Figura 21), e isolados de campo de *B. abortus* e *B. canis*, sugerindo que esta deleção não é exclusiva da *B. ovis*. Os fragmentos de 468pb, obtidos das cepas de referência de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis* e *B. suis*, a partir dos *primers* BovS e BovAS, também foram sequenciados e a análise de similaridade por BLAST revelou identidade de 99% com uma região do cromossomo I das *B. ovis* disponíveis no GenBank.

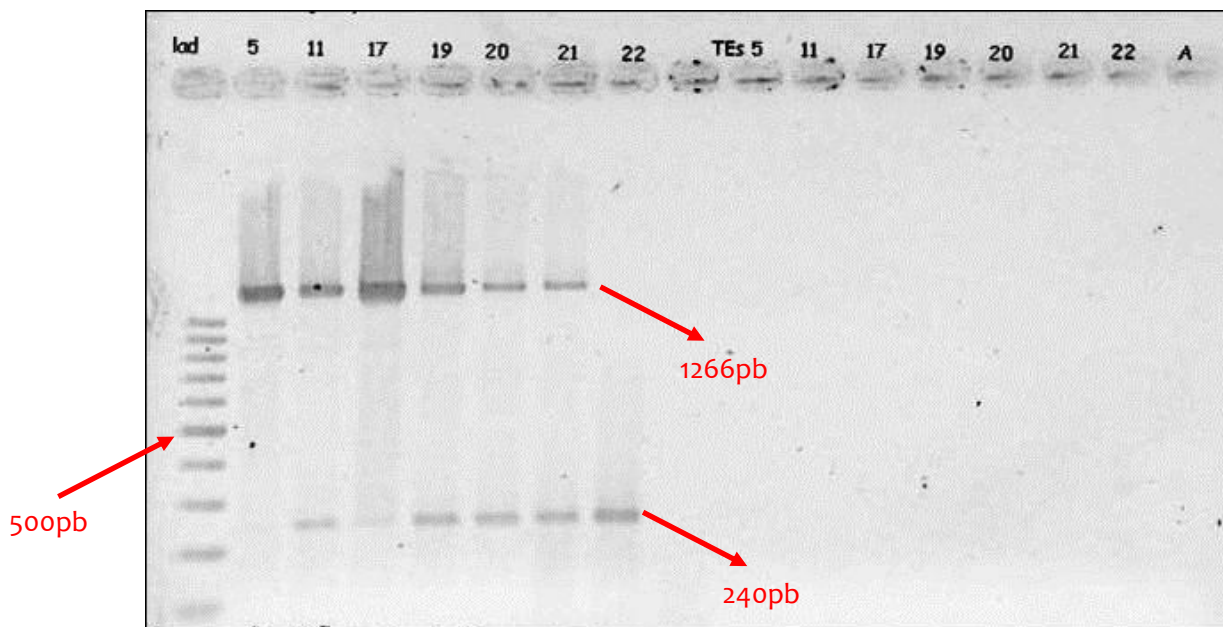


Ladd- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 16M- *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 63.9- *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; Ether- *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 544- *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 86.6- *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; Tul- *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 292- *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; B319- *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 870- *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; C68- *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 1330- *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; Thom- *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 686- *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 40- *B. suis* biovar 4 estirpe 40; Bneo - *B. neotomae* estirpe 5K33; Bov- *B. ovis* estirpe 63/290; 2308- *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; Bcan666- *B. canis* estirpe RM6/66; 10- *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); A- controle negativo de amplificação.

**Figura 21 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados de 468pb, das amostras de *B. melitensis* bvs. 63/9 e Ether, *B. abortus* bv. C68 e *B. suis* bv 1330, com os *primers* BovS e BovAS, cujo único fragmento esperado era de 468pb das *B. ovis***

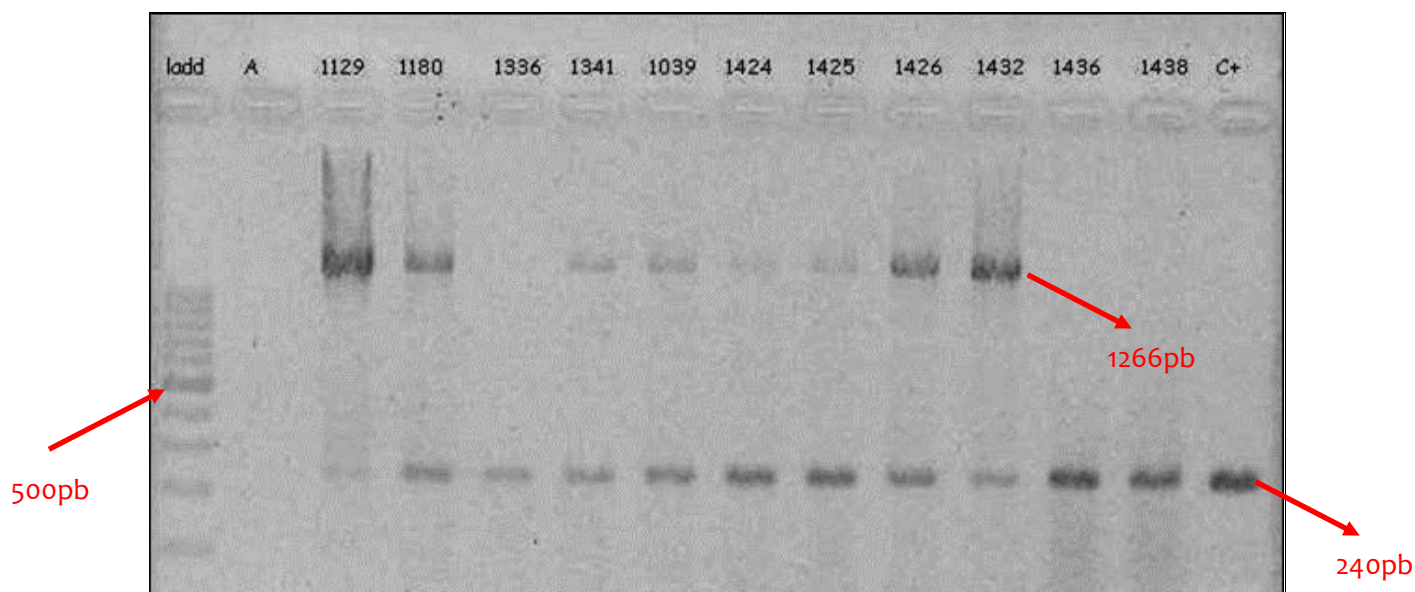
Também houve similaridade deste fragmento com sequências de outras espécies de *Brucella* em duas regiões do genoma no cromossomo I, equidistantes cerca de 15.000pb, confirmando assim a existência da deleção estudada na sequência de referência de *B. ovis* disponível no GenBank. Esta região, no entanto, não pode ser utilizada como marcador, visto que foi verificada amplificação do fragmento esperado para *B. ovis* que continha a deleção, também em outras espécies além da *B. ovis*, indicando que estas também apresentam esta deleção.

O par de *primers* BcanS e BcanAS amplificaram o fragmento de 240pb esperado apenas para a espécie de *B. canis* em quase todas amostras de referência e de campo de *B. canis*, entretanto este fragmento foi amplificado também em outras espécies das amostras de referência de *Brucella* e de isolados de campo de *B. abortus* (Figura 22), que não deveriam amplificá-lo segundo as buscas de especificidade dos *primers* no *Primer BLAST*. Adicionalmente, fragmentos de 1180 a 1307pb, esperados apenas para as outras espécies de *Brucella* foram amplificados também na maioria das amostras de campo de *B. canis* (Figura 23), demonstrando a instabilidade deste marcador.



Lad- Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 5, 11, 17, 19, 20, 21, 22- estirpes de *B. abortus* isoladas de campo; TEs 5, 11, 17, 19, 20, 21, 22 - controles negativos de extração; A- controle negativo de amplificação.

**Figura 22 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados de 240pb, das amostras de *B. abortus* de campo, com os *primers* BcanS e BcanAS, cujos únicos fragmentos esperados eram os de 1266pb**



Ladd– Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; A– controle negativo de amplificação; 1129, 1180, 1336, 1341, 1039, 1424, 1425, 1426, 1432, 1436, 1438– estirpes de *B. canis* isoladas de campo; C+– *B. canis* estirpe RM6/66.

**Figura 23 – Gel de agarose demonstrando a amplificação de fragmentos não esperados maiores do que 1000pb, das amostras de *B. canis* de campo, com os primers BcanS e BcanAS, cujos únicos fragmentos esperados eram os de 240pb**

Os fragmentos não esperados de 240pb, obtidos das *B. melitensis*, *B. suis*, e *B. neotomae*, a partir dos primers BcanS e BcanAS foram sequenciados e a análise de similaridade por BLAST das sequências obtidas revelou identidade de 99% com apenas uma região do cromossomo I da *B. canis* disponível no GenBank.

Também houve similaridade desta sequência, com duas pequenas regiões do genoma no cromossomo I de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. ovis*, equidistantes entre si cerca de 1.000pb, correspondente a região que estaria deletada na *B. canis*, mas presente em nas outras espécies. Os resultados do BLAST sugerem a existência desta deleção de cerca de 1.000pb na sequência de *B. canis* que se encontra disponível no GenBank, entretanto ficou comprovado que esta deleção não é estável na *B. canis*, visto que o sequenciamento determinou a presença desta deleção em outras espécies de *Brucella* também.

Os fragmentos maiores do que 1.000pb, não esperados das cepas de campo de *B. canis*, obtidos com os primers BcanS e BcanAS, também foram sequenciados e a análise de similaridade por BLAST revelou identidade de 99% com apenas uma região do cromossomo I das *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* e *B. abortus* disponível no GenBank, indicando que esta sequência estaria presente nestas espécies, mas não na *B. canis*.

Verificamos também que a sequência de 240pb se alinhou as extremidades da sequência maior do que 1.000pb. Com análise de similaridade por BLAST foi observado que as duas sequências possuem dois fragmentos internos menores (de cerca de 20pb), os quais se encontram separados na sequência de 1.000pb pela presença de um *indel*, e unidos na sequência de 240pb que não possui o *indel*.

O BLAST também revelou que a sequência destes fragmentos se repete em todas as espécies de *Brucella*, sempre muito próximos um do outro ou separados pela presença de um *indel*, em diversas regiões do cromossomo que parecerem estar ligadas a diferentes genes e, visto que, encontramos estes fragmentos tanto a sequência de 240pb como na maior do que 1000pb, separados apenas por um *indel*, provavelmente estes fragmentos estão envolvidos com mecanismos de silenciamento ou ativação gênica nas brucelas e, portanto, essa região não seria marcadora de polimorfismo para *B. canis*.

Além da instabilidade da região marcadora de polimorfismo dos *primers* BovS/BovAS e BcanS/BcanAS, outra explicação possível para os resultados encontrados é o polimorfismo observado ser único da cepa sequenciada e não estar presente nas cepas de campo, que podem apresentar uma variabilidade intra-espécie. O número muito reduzido ainda, de sequências de *Brucella* disponíveis no GenBank, onde para maioria das regiões polimórficas estudadas apenas a sequência de cepa de referência está disponível, dificulta o diagnóstico deste tipo de ocorrência.

Na tentativa de elucidar a instabilidade desta região polimórfica estudada para *B. canis*, resolveu-se testar também os *primers* BMEI<sub>1434F</sub>/BMEI<sub>1436R</sub> e BMEI<sub>1436F</sub>/BMEI<sub>1435R</sub>, e compará-los ao BcanS/BcanAS, frente às 18 cepas de referência de *Brucella*, visto que todos que foram desenhados para a mesma região polimórfica. Os resultados encontram-se sumarizados no Quadro 5.



Amostra	B can S/AS	BME I 1434F/1436R	BMEI 1436F/1435R
<b>B. ab. Bv. 1</b>	1 (240pb) *‡	0 *‡	1 (794pb) ‡
<b>B. ab. Bv. 1 (2308)</b>	1 (1266pb)	1 (1638pb)	1 (794pb)
<b>B. ab. Bv. 2</b>	1 (1266pb)	1 (1638pb)	1 (794pb)
<b>B. ab. Bv. 3</b>	1 (1266pb)	0 *‡	1 (794pb)
<b>B. ab. Bv. 4</b>	0 *	0 *	0 *
<b>B. ab. Bv. 5</b>	1 (240pb) *‡	0 *‡	1 (794pb) ‡
<b>B. ab. Bv. 6</b>	0 *	0 *	0 *
<b>B. ab. Bv. 9</b>	1 (240pb) *‡	0 *‡	1 (794pb) ‡
<b>B. mel. Bv. 1</b>	1 (240pb/1266pb) *	1 (607pb/1633pb) *	1 (794pb)
<b>B. mel. Bv. 2</b>	1 (240pb/1266pb) *	1 (1633pb)	1 (794pb)
<b>B. mel. Bv. 3</b>	1 (240pb/1266pb) *	0 *‡	1 (794pb)
<b>B. sui. Bv. 1</b>	1 (240pb) *‡	0 *‡	1 (813pb) ‡
<b>B. sui. Bv. 2</b>	1 (240pb) *‡	1 (1674pb)	1 (813pb) ‡
<b>B. sui. Bv. 3</b>	1 (240pb) *‡	1 (607pb) *‡	1 (813pb) ‡
<b>B. sui. Bv. 4</b>	1 (240pb/1307pb) *	1 (1674pb)	1 (813pb)
<b>B. neo.</b>	1 (240pb/>1000pb) *	0*‡	1 (>700pb)
<b>B. ovis</b>	1 (1180pb)	0*‡	1 (794pb)
<b>B. canis</b>	0 *	0 *	0
<b>B. canis Fiocruz*</b>	1 (240pb)	1 (607pb)	0

0 ausência de amplificação

1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado)

\* representam resultados diferentes do esperado para o *primer* analisado

‡ representam resultados discordantes na comparação entre os *primers*.

Quadro 5 – Resultados dos testes com os *primers* BMEI<sub>1434F</sub>/BMEI<sub>1436R</sub>, BMEI<sub>1436F</sub>/BMEI<sub>1435R</sub> e BcanS/BcanAS, frente às 18 cepas de referência de *Brucella*

Os resultados da tabela sugerem que esta região é bastante instável, visto que foram obtidos resultados diferentes do esperado para os três *primers* e, também, discordantes entre si quando eles foram comparados frente às mesmas amostras. Resultados similares a estes foram obtidos também quando se testou os mesmos *primers*, frente a 46 isolados de campo de *B. canis*, e desaconselham a utilização destes *primers* com finalidades diagnósticas.

Adicionalmente, ressalta-se que apesar das duas amostras de referência de *B. canis* resultarem negativas, como esperado, com o par de *primer* BMEI<sub>1436F</sub>/BMEI<sub>1435R</sub>, desenvolvido por López-Goñi et al. (2008) para diferenciação das *B. canis* na Multiplex Bruce-ladder, todos os 46 isolados de campo brasileiros testados, provenientes de 17 canis diferentes do estado de São Paulo, resultaram positivas com estes *primers*. Este resultado está relacionado com a variabilidade intra-espécie desta região nas *B. canis*, fato também observado previamente pelo autor, em

aproximadamente 50% dos isolados de campo do estudo, que apresentaram amplificação de fragmentos inesperados para esta espécie, e foram erroneamente classificados como *B. suis* pela metodologia Bruce-ladder.

Como através da análise dos polimorfismos descritos em literatura, conseguimos padronizar apenas uma PCR para diferenciação de *B. abortus*, começou-se os testes com os *primers* desenhados a partir do alinhamento múltiplo das sequências de *Brucella*, para os quais também se padronizou as condições de reação e a especificidade dos mesmos foi testada, até o momento, nas 18 cepas de referência de *Brucella*, 21 cepas de campo de *B. abortus*, um número variável de cepas de campo de *B. canis* para cada *primer*. Alguns *primers* ainda foram testados frente às amostras de *B. suis*.

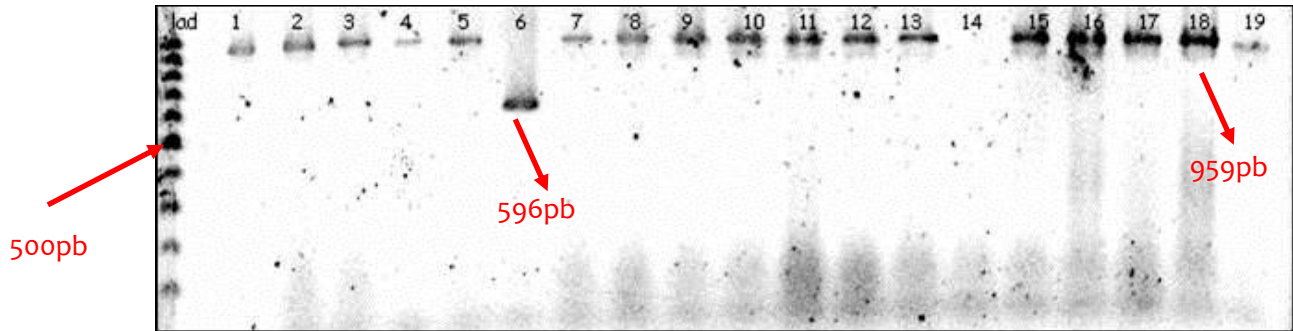
O teste de especificidade do *primer* Bcan<sub>CapD</sub>, desenhado para diferenciação *B. canis*, resultou em amplificação dos fragmentos esperados de 596pb para a cepa de referência de *B. canis* RM6/66 da Fiocruz e 954pb para as demais espécies (Figura 24), exceto para a *B. abortus* bv. 4 estirpe 870 que não apresentou amplificação e para a cepa de referência de *B. canis* de origem do RS, que sugere estar com problemas visto que apresentou morfologia lisa nas provas de acriflavina e coloração por cristal de violeta e reagiu positivamente com os dois *primers* desenhados para *B. melitensis*.

Dos 205 isolados de campo de *B. canis* testados com este *primer*, 197 (96,1%) apresentaram-se positivos (Figura 25), sendo que 196 delas amplificaram o fragmento de 596pb esperado para as amostras de *B. canis* e uma amostra amplificou o fragmento de 954pb esperado para outras espécies não *B. canis*. Esta última amostra resultou negativa com o *primer* Bcan<sub>Acet</sub> também desenhado para diferenciação de *B. canis*, mas positiva com *primer* Bcasu<sub>β<sub>lac</sub></sub>, sugerindo ser uma *B. suis*. Esta mesma amostra foi posteriormente submetida a teste com a metodologia Bruce-ladder, realizada no laboratório do Prof. Andrey Pereira Lage da Escola de Veterinária da UFMG, apresentando o mesmo padrão de bandas revelado para as *B. suis*.

Das oito (3,9%) amostras que não apresentaram a amplificação com este *primer*, três resultaram positivas com o *primer* Bcan<sub>Acet</sub>, sugerindo uma diferença de sensibilidade entre estes dois *primers*. Outras três amostras foram negativas com todos os *primers* desenhados e duas amostras foram negativas com outro *primer*

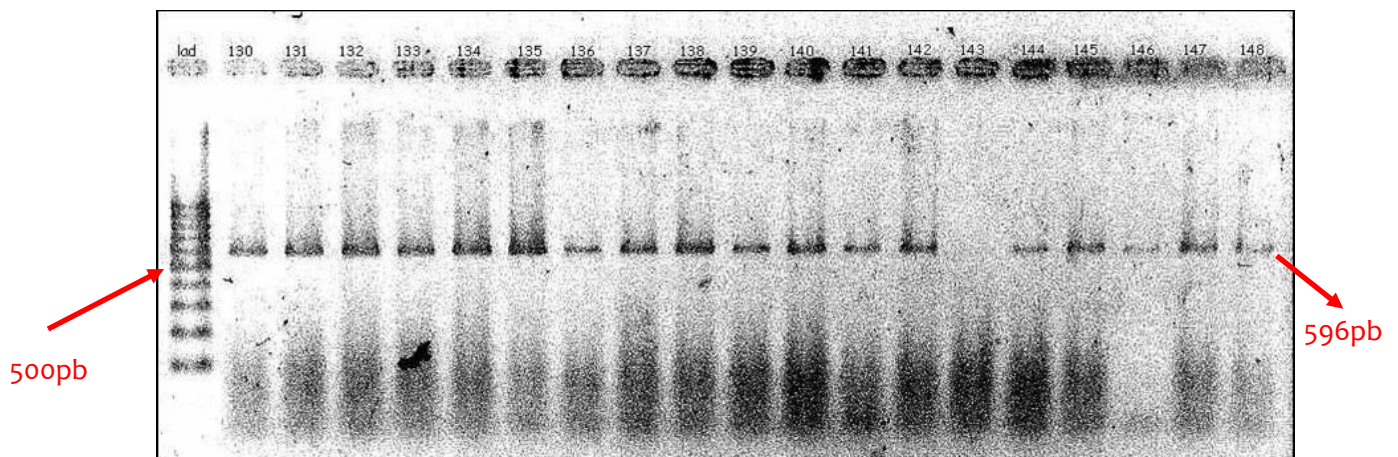


desenhado  $B_{can_{Acet}}$  para identificação de *B. canis*, mas resultaram positivas com a amplificação com o *primer*  $B_{casu_{\beta_{lac}}}$ , sugerindo também que pudessem ser *B. suis*.



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40; 20 – controle negativo de amplificação

**Figura 24 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 596pb da cepa de *B. canis* e 954pb das demais espécies, com *primer*  $B_{can_{CapD}}$  desenhado para diferenciação de *B. canis***



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 130 148 – isolados de campo de *B. canis*.

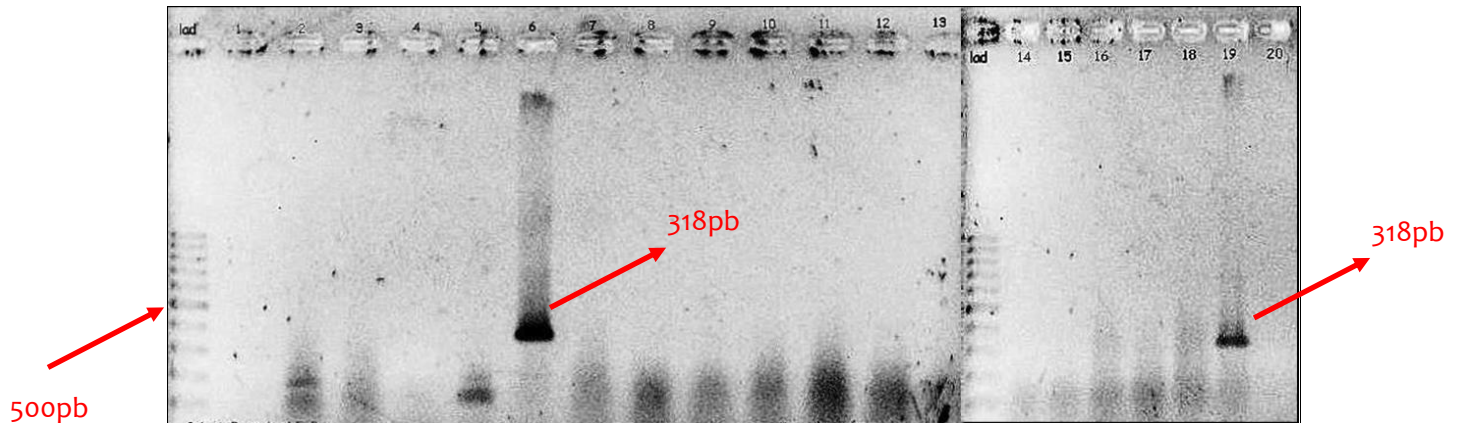
**Figura 25 – Gel de agarose dos resultados da PCR demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 596pb para quase todas os isolados de campo de *B. canis*, com *primer*  $B_{can_{CapD}}$  desenhado para diferenciação de *B. canis***

Dos 21 isolados de campo de *B. abortus* testadas com este *primer*, 11 (52,4%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 954pb e 10 (47,6%) não apresentaram amplificação, entretanto nenhuma amostra obteve classificação errônea. Das cinco amostras de *B. suis* testadas, 3 (60%) resultaram positivas apresentando o fragmento esperado de 954pb e 2 (40%) não apresentaram amplificação.

Os fragmentos 596pb, obtidos da cepa de referência e de alguns isolados de campo *B. canis*, a partir dos *primers* Bcan<sub>CapD</sub> foram sequenciados e a análise de similaridade por BLAST das sequências obtidas revelou identidade de 100% com uma região do cromossomo I da *B. canis* relacionada a biossíntese de glicoproteínas capsulares Cap D. Também houve similaridade desta sequência, com duas regiões do genoma no cromossomo I de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. ovis*, equidistantes entre si cerca de 350pb, correspondente a região que estaria deletada na *B. canis*, mas presente em nas outras espécies.

Do fragmento de 954pb, amplificado das outras espécies, não se obteve *contig*, visto que nenhum dos sequenciamentos realizados gerou cromatogramas que pudessem ser utilizados, apresentando picos com escores de qualidade Phred menor que 20. Isto pode ser consequência do tamanho relativamente grande do fragmento associado ao baixo poder de resolução do sequenciador ABI 377, utilizado neste estudo.

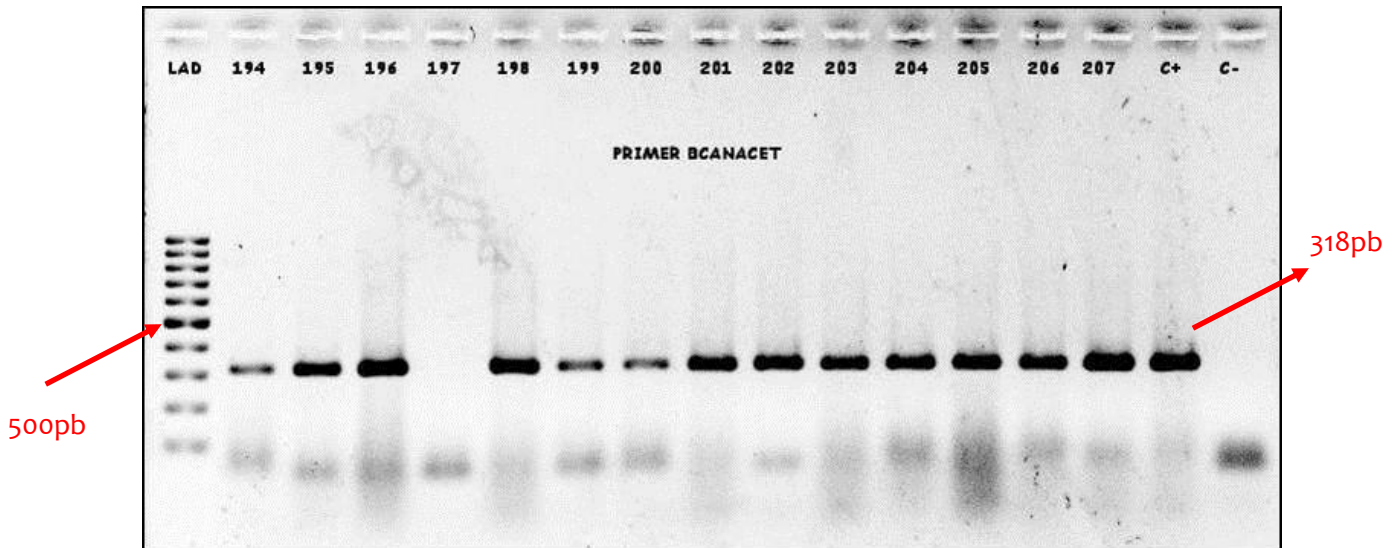
O teste realizado com o *primer* Bcan<sub>Acet</sub>, desenhado para diferenciação *B. canis*, frente as cepas de referência de *Brucella* para avaliar sua especificidade, resultou em amplificação do fragmento esperado de 318pb para a cepa de referência de *B. canis* RM6/66 da Fiocruz e uma amplificação inesperada da *B. suis* bv.4 estirpe 40 (Figura 26). A outra cepa de referência de *B. canis*, também não apresentou a amplificação esperada para este *primer*.



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40; 20 – controle negativo de amplificação.

**Figura 26 – Géis de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* com *primer* Bcan<sub>Acet3</sub>, desenhado para diferenciação de *B. canis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 318pb da cepa de referência de *B. canis* e uma amplificação inesperada da cepa de *B. suis* bv. 4**

Dos 205 isolados de campo de *B. canis* testados com este *primer*, 199 (97,1%) apresentaram-se positivos amplificando o fragmento de 318pb esperado para as amostras de *B. canis* (Figura 27). Das seis (2,9%) amostras que não apresentaram a amplificação com este *primer*, cinco também haviam sido negativas com o *primer* Bcan<sub>CapD</sub> e uma amostra havia sido positiva com o Bcan<sub>CapD</sub> apresentando a amplificação de 954pb esperada das outras amostras que não *B. canis*, destas três resultaram positivas com o *primer* Bcasu<sub>β\_lac</sub>, sugerindo que pudessem ser *B. suis* e as outras três amostras foram negativas com todos os *primers* desenhados.



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 194 a 207 – isolados de campo de *B. canis*; C+ – controle positivo de amplificação; C- – controle negativo de amplificação.

**Figura 27 – Gel de agarose dos resultados da PCR dos isolados de campo de *B. canis* com primer Bcan<sub>Acet1</sub>, desenhado para diferenciação de *B. canis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 318pb para quase todas as amostras**

Das cinco amostras testadas de *B. suis*, todas (100%) resultaram negativas a amplificação com este *primer*, entretanto, como estas amostras não se encontravam biotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz e apenas o DNA nos foi concedido, não foi possível proceder a biotipagem destas, e não pudemos esclarecer o problema da provável inespecificidade deste *primer* com *B. suis* bv. 4.

O fragmento 318pb obtido da cepa de referência de *B. canis* da Fiocruz com *primer* Bcan<sub>Acet1</sub>, foi sequenciado e a análise de similaridade por BLAST desta sequência há cerca de 4 meses atrás, havia revelado 100% de identidade com uma região do cromossomo I da *B. canis* relacionada a uma N-acetiltransferase. No entanto, o BLAST foi repetido, para fins de redação da qualificação, e devido à inclusão no banco de dados, dos *supercontigs* de sequências, ainda não montadas de algumas espécies e biovars de *Brucella*, neste segundo momento foi observada também 100% de similaridade desta sequência com um *supercontig* de uma região no cromossomo I do bv. 4 de *B. suis*, cujo genoma completo ainda não foi montado.

Isso demonstra a inespecificidade deste *primer* em distinguir as espécies de *B. canis* e *B. suis*, fato que não havia sido observado anteriormente devido à ausência desta sequência no banco de dados, quando foi realizada a busca de especificidade dos *primers*. Adicionalmente, demonstra a aumento do número de sequências de *Brucella* spp. no banco de dados do GenBank, cujo crescimento é exponencial desde meados de 1990<sup>1</sup>.

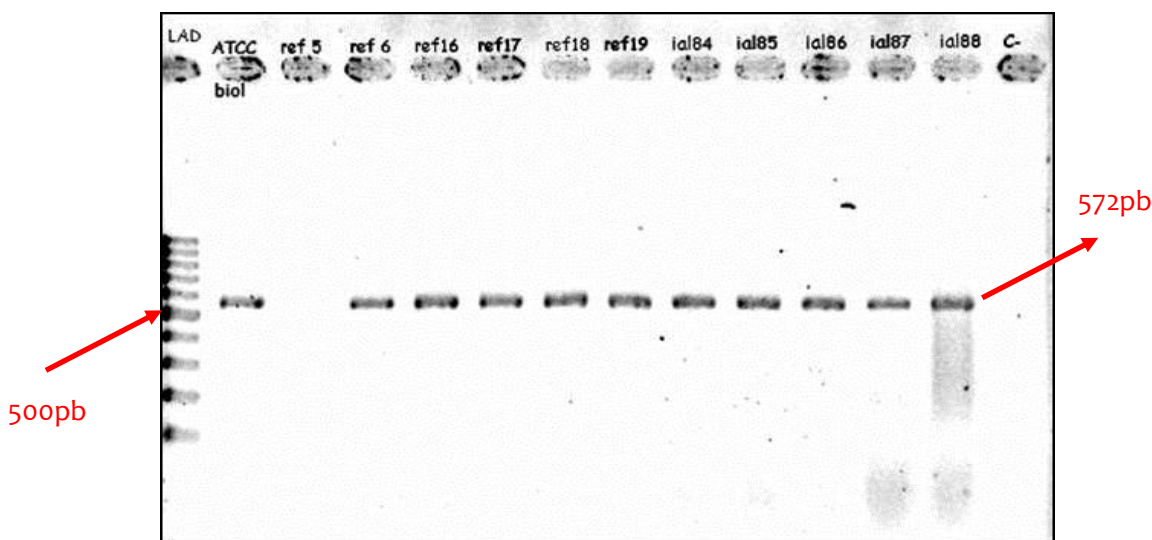
O teste de especificidade do *primer* Bcasu $\beta$ \_lac, desenhado para diferenciação *B. canis*/*B. suis*, resultou em amplificação dos fragmentos esperados de 572pb para a cepa de referência de *B. canis* RM6/66 da Fiocruz e para os quatro biovars de *B. suis* (Figura 28), entretanto a *B. melitensis* bv.1 estirpe 16M e a *B. abortus* bv. 3 estirpe Tulya também apresentaram ampliações inesperadas com este *primer*, e adicionalmente a outra cepa de referência de *B. canis* oriunda do RS, também não apresentou a amplificação esperada.

Das cinco amostras testadas de *B. suis*, todas (100%) resultaram positivas a amplificação com este *primer* (Figura 11). Apenas seis amostras de *B. canis* foram testadas com este *primer*, destas três (50%) testaram positivas, sendo que uma delas já havia sido positiva com o Bcan<sub>Cap</sub> amplificando o fragmento de 954pb esperado para as espécies que não fossem *B. canis* e as outras duas haviam testado negativas tanto com o *primer* Bcan<sub>Cap</sub> quanto com o Bcan<sub>Acet</sub>. As outras três amostras negativas ao Bcasu $\beta$ \_lac, referem-se às amostras que não conseguiram ser identificadas com nenhum outro *primer*.

---

<sup>1</sup> Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats.html>. Acesso em: Novembro 2010.

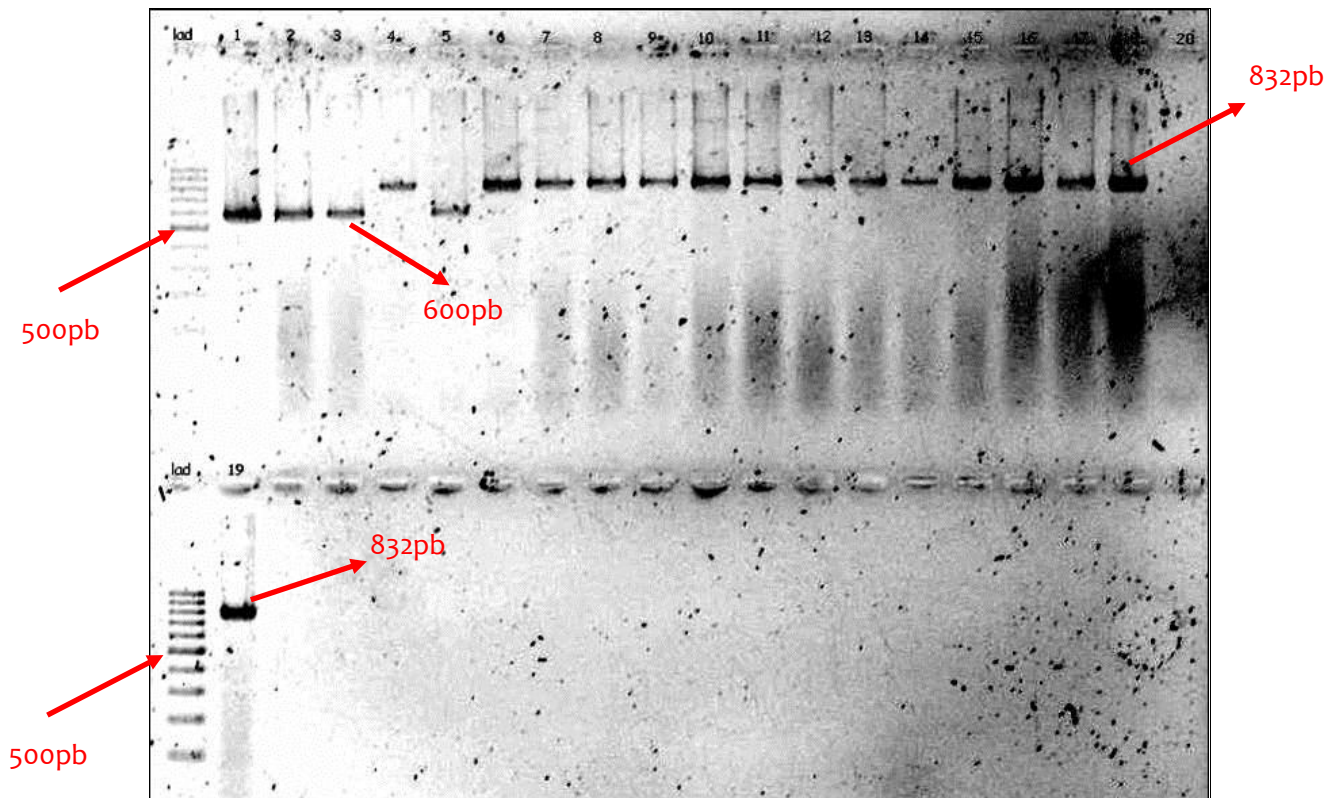




Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, ATCC Biol – *B. canis* estirpe RM6/66 (Instituto Biológico); R5- *B. canis* estirpe RM6/66; R6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); R16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; R17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; R18– *B. suis* biovar 3 estirpe 686; R19– *B. suis* biovar 4 estirpe 40; ial 84 – cepa *B. suis* IOC 726 (Adolfo Lutz); ial 85 – cepa *B. suis* 1330 Mineapolis (Adolfo Lutz); ial 86 – cepa *B. suis* IOC 725 (Adolfo Lutz); ial 87 – cepa *B. suis* (Adolfo Lutz); ial 88 – cepa *B. suis* 14306 HER (Adolfo Lutz); C- – controle negativo de amplificação.

**Figura 28 – Gel de agarose dos resultados da PCR de amostras de referência de *B. canis* e *B. suis* e de isolados de *B. suis* com primer Bcasu<sub>β\_lac</sub>, desenhado para diferenciação de *B. canis*/*B. suis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 572pb para quase todas as amostras**

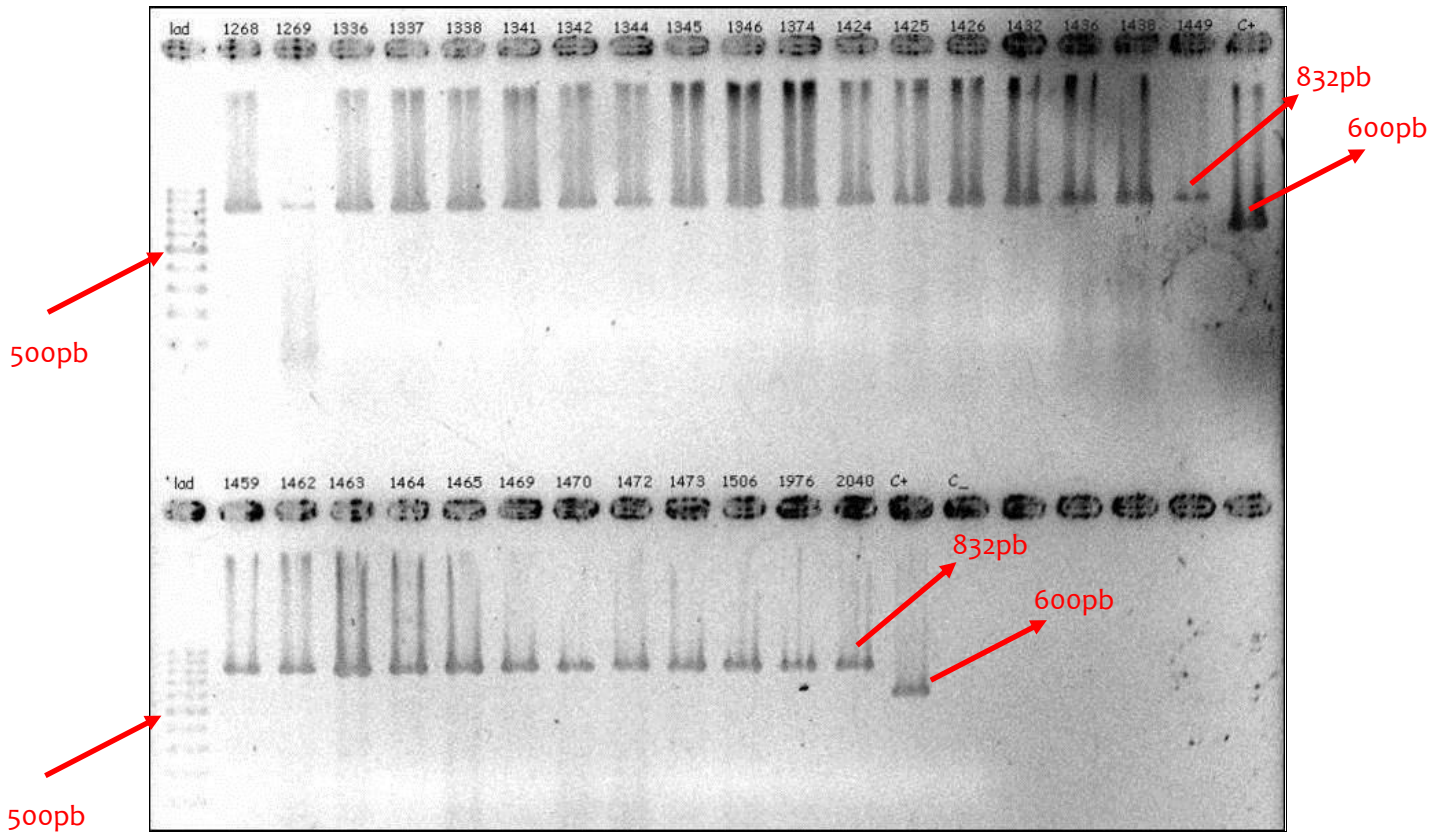
A PCR realizada com o primer Bmel<sub>Omp31</sub>, desenhado para diferenciação *B. melitensis*, frente as cepas de referência de *Brucella* para avaliar sua especificidade, resultou em amplificação do fragmento esperado de 600pb para a cepas de referência de *B. melitensis* biovares 1, 2 e 3 estirpes 16M, 63/9 e Ether, respectivamente, e da cepa de referência de *B. canis* oriunda do RS, que apresentou resultados de morfologia lisa nas provas de acriflavina e coloração por cristal de violeta e resultou negativa nos testes com os dois primers desenhados para *B. canis* e positiva para os dois primers de *B. melitensis*. As outras espécies de *Brucella* e seus biovares, apresentaram o fragmento esperado de 832pb (Figura 29).



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40; 20 – controle negativo de amplificação.

**Figura 29 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* com primer Bmel<sub>Omp</sub>, desenhado para diferenciação de *B. melitensis*, demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 600pb dos três biovars da cepa de referência de *B. melitensis* e 832pb das demais espécies e biovars**

Dos 21 isolados de campo de *B. abortus* testadas com este primer, 19 (90,5%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 832pb e 2 (9,5%) não apresentaram amplificação, entretanto nenhuma amostra obteve classificação errônea. Dos 30 isolados de campo de *B. canis* testados, todos (100%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 832pb (Figura 30).

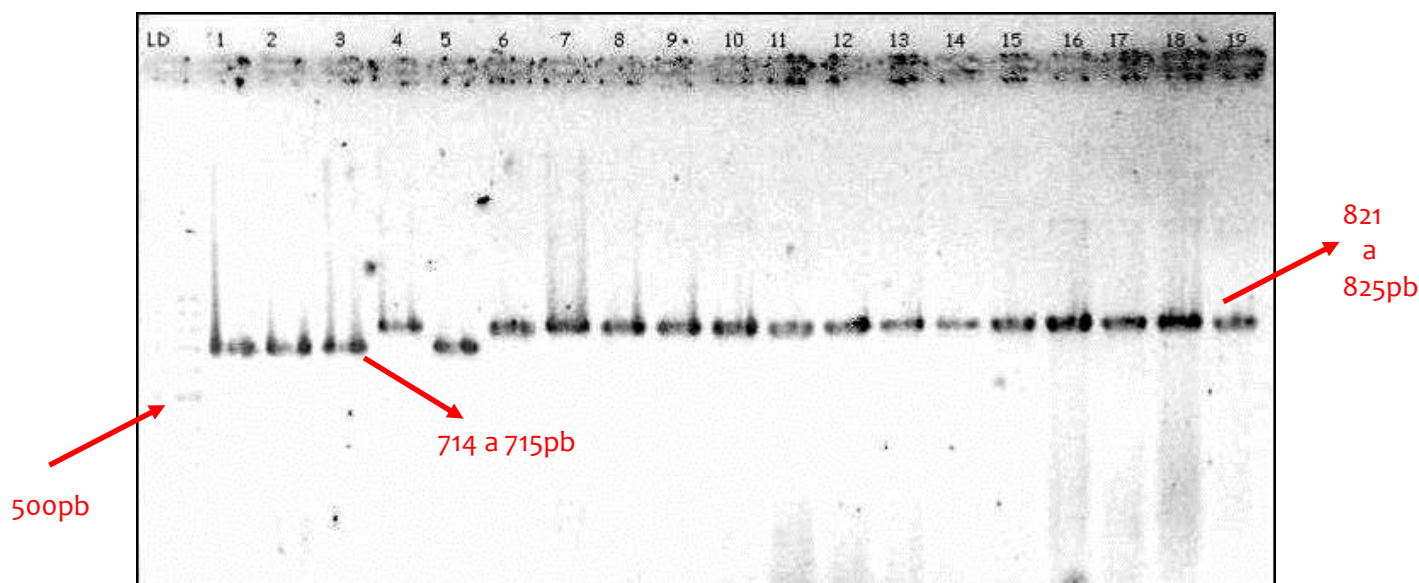


Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 1268 a 2040 – isolados de campo de *B. canis*; C+ – cepa de *B. melitensis* utilizada como controle positivo de amplificação; C- – controle negativo de amplificação.

**Figura 30 – Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de *B. canis* com *primer* Bmel<sub>Omp</sub>, desenhado para diferenciação de *B. melitensis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 832pb para todas as amostras testadas**

O teste de especificidade do *primer* Bmel<sub>COA</sub>, desenhado para diferenciação *B. melitensis*, resultou em amplificação do fragmento esperado de 714-5pb para a cepas de referência de *B. melitensis* biovars 1, 2 e 3 estirpes 16M, 63/9 e Ether, respectivamente, e da cepa de referência de *B. canis*, que resultou negativa nos testes com os dois *primers* desenhados para esta espécie e positiva para os dois *primers* de *B. melitensis*. As outras espécies de *Brucella* e seus biovars, também apresentaram o fragmento esperado de 821pb para *B. canis* e 825pb para *B. ovis*, *B. suis* e *B. abortus* (Figura 31).





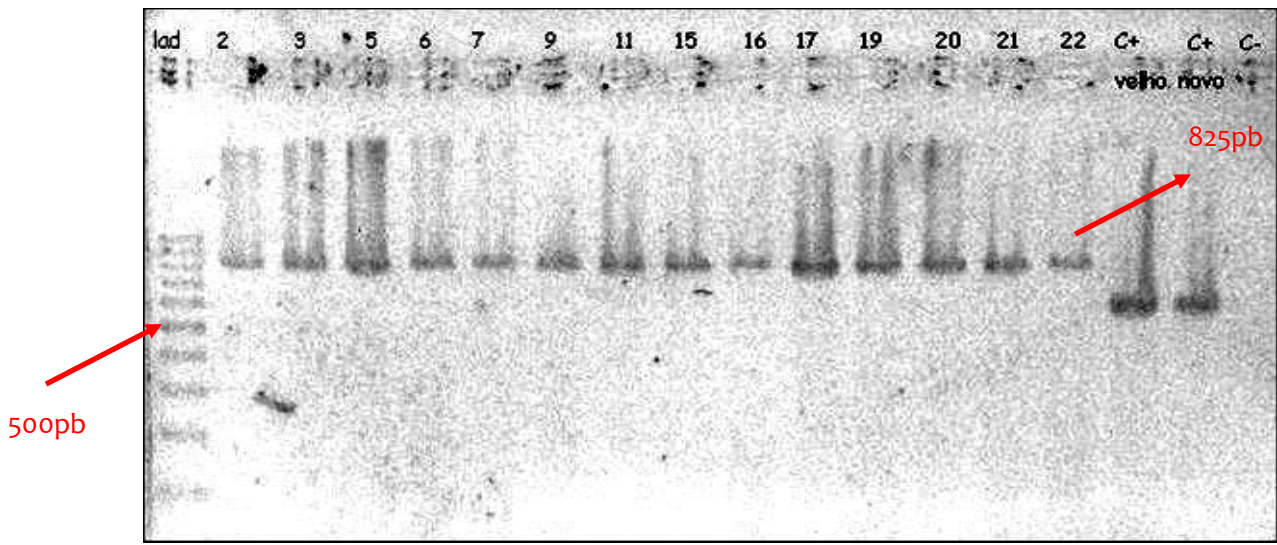
Ld – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40.

**Figura 31 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* com *primer* Bmel<sub>coA</sub>, desenhado para diferenciação de *B. melitensis*, demonstrando a amplificação dos fragmentos esperados de 714-5pb dos três biovars da cepa de referência de *B. melitensis*, 821pb para *B. canis* e 825pb para *B. ovis*, *B. suis* e *B. abortus***

Dos 21 isolados de campo de *B. abortus* testadas com este *primer*, 19 (90,5%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 825pb e 2 (9,5%) não apresentaram amplificação, entretanto nenhuma amostra obteve classificação errônea. Dos 30 isolados de campo de *B. canis* testados, todos (100%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 821pb para esta espécie (Figura 32).

Foram sequenciados os fragmentos de 714pb obtido da *B. melitensis* e de 825pb obtidos das *B. abortus* e *B. suis* com *primer* Bmel<sub>coA</sub>. A análise de similaridade por BLAST dos fragmentos sequenciados da *B. abortus* e *B. suis* apresentava alta similaridade com as sequências de *B. canis*, *B. ovis*, *B. abortus* e *B. suis*, pois estas espécies não apresentavam a deleção de 110 nucleotídeos na região que codifica a Acetil CoA. Esse fragmento também apresentou similaridade com as sequências de

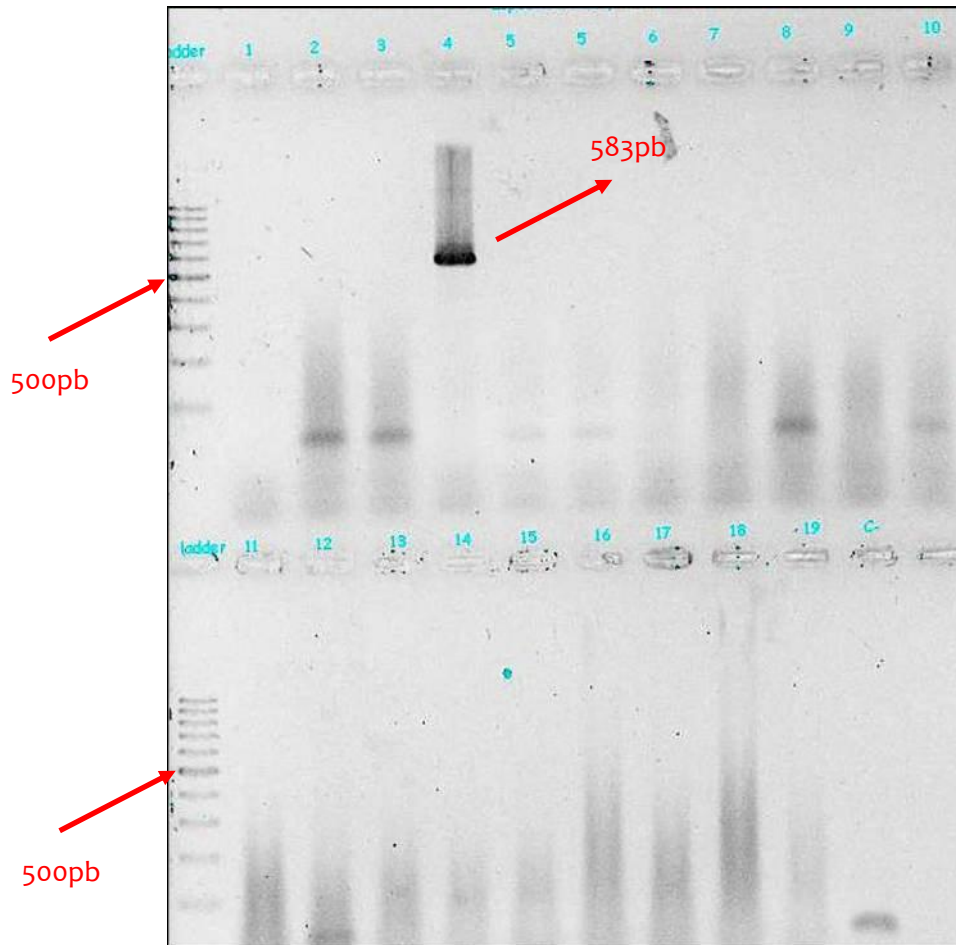
*B. melitensis*, entretanto os alinhamentos eram menores, pois as sequências de *B. melitensis* apresentavam a deleção. O fragmento sequenciado da *B. melitensis*, utilizando o mesmo *primer*, apresentou alta similaridade com todas as sequências das espécies de brucela, porém este alinhamento era menor que os obtidos com as sequências de *B. abortus* e *B. suis*, pois o fragmento da *B. melitensis* apresentava a deleção esperada na região codificadora da Acetil CoA nessa espécie.



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 2 a 21 – isolados de campo de *B. abortus*; C+ – cepas de *B. melitensis* utilizada como controle positivo de amplificação; C- – controle negativo de amplificação.

**Figura 32 – Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de *B. abortus* com *primer* Bmel<sub>coA</sub>, desenhado para diferenciação de *B. melitensis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 825pb para todas as amostras testadas**

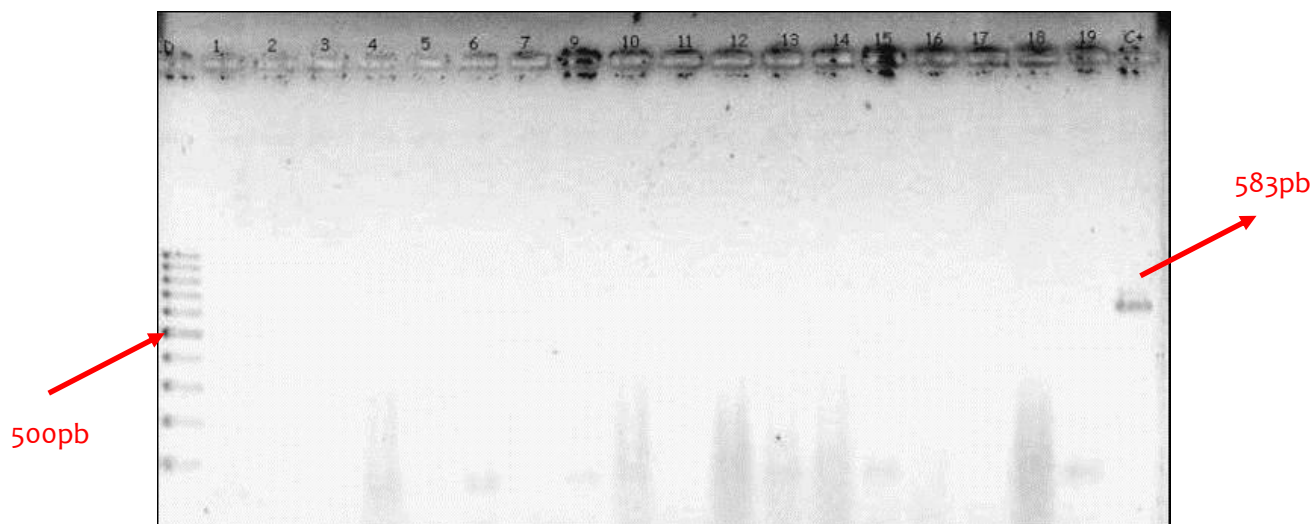
O teste de PCR do *primer* Bov<sub>Omp</sub>, desenhado para diferenciação *B. ovis*, frente as cepas de referência de *Brucella*, para avaliar sua especificidade, resultou em amplificação do fragmento esperado de 583pb para a cepa de referência desta espécie. As outras espécies de *Brucella* e seus biovars, como esperado não apresentaram amplificação (Figura 33).



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40; C – controle negativo de amplificação.

**Figura 33 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* com *primer* Bov<sub>Omp</sub>, desenhado para diferenciação de *B. ovis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 583pb para *B. ovis***

Dos 21 isolados de campo de *B. abortus* e 35 isolados de campo de *B. canis*, testados com este *primer*, nenhum apresentou amplificação do fragmento 583pb, esperado apenas para *B. ovis* (Figura 34).



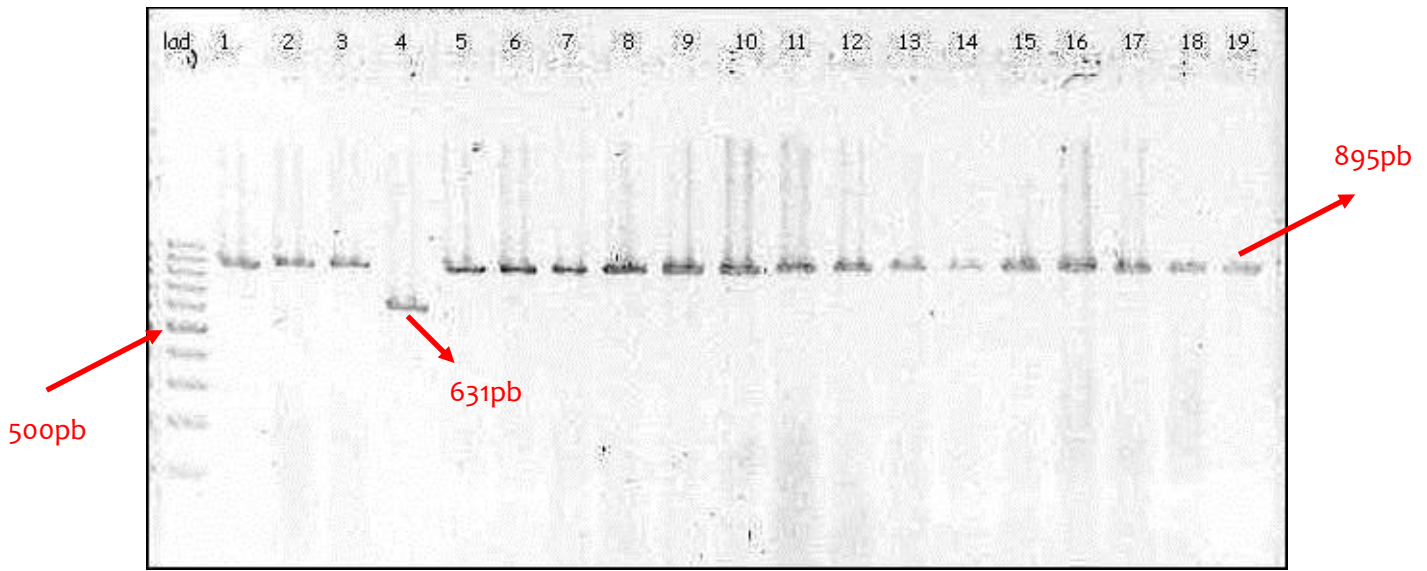
Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases; 1 a 19 – isolados de campo de *B. abortus*; C+ – cepa de *B. ovis* utilizada como controle positivo de amplificação; C- – controle negativo de amplificação.

**Figura 34 – Gel de agarose dos resultados da PCR de isolados campo de *B. abortus* com *primer* Bov<sub>Omp</sub>, desenhado para diferenciação de *B. ovis*, demonstrando a ausência de amplificação do fragmento de 583pb esperado apenas para as amostras de *B. ovis***

A análise de similaridade por BLAST, do sequenciamento do fragmento 583pb obtido com a amplificação da cepa de referência de *B. ovis* com *primer* Bov<sub>Omp</sub>, revelou 100% de identidade com uma região do cromossomo I da *B. ovis* relacionada a uma OMP e similaridades igualmente altas de cerca 97% também com outras espécies de *Brucella*. Como o DNA das espécies de *Brucella* apresenta similaridades maiores do que 90% e foi utilizada uma mutação de cerca de 20 nucleotídeos, específica da *B. ovis* na região desta OMP, para ancoragem de um dos *primers*, e sabendo que as extremidades dos sequenciamentos, que correspondem à região dos *primers* nunca apresentam uma boa resolução, é de se esperar que tenhamos encontrado alta similaridade deste fragmento em todas as espécies.

A PCR realizada com o *primer* Bov<sub>TABC</sub>, desenhado para diferenciação *B. ovis*, frente as cepas de referência de *Brucella*, para avaliar sua especificidade, resultou em amplificação do fragmento esperado de 631-5pb para a cepas de referência de

*B. ovis* e do fragmento de 895pb para *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. neotomae* (Figura 35).



Lad – Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, 1 – *B. melitensis* biovar 1 estirpe 16M; 2 – *B. melitensis* biovar 2 estirpe 63/9; 3 – *B. melitensis* biovar 3 estirpe Ether; 4 – *B. ovis* estirpe 63/290; 5 – *B. canis* estirpe RM6/66; 6 – *B. canis* estirpe RM6/66 (FIOCRUZ); 7 – *B. neotomae* estirpe 5K33; 8 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 544; 9 – *B. abortus* biovar 1 estirpe 2308; 10 – *B. abortus* biovar 2 estirpe 86/8/59; 11 – *B. abortus* biovar 3 estirpe Tulya; 12 – *B. abortus* biovar 4 estirpe 292; 13 – *B. abortus* biovar 5 estirpe B3196; 14 – *B. abortus* biovar 6 estirpe 870; 15 – *B. abortus* biovar 9 estirpe C68; 16 – *B. suis* biovar 1 estirpe 1330; 17 – *B. suis* biovar 2 estirpe Thomsen; 18 – *B. suis* biovar 3 estirpe 686; 19 – *B. suis* biovar 4 estirpe 40.

**Figura 35 – Gel de agarose dos resultados da PCR das cepas de referência de *Brucella* com *primer* BOV<sub>TABC</sub>, desenhado para diferenciação de *B. ovis*, demonstrando a amplificação do fragmento esperado de 631pb para *B. ovis* e 895pb para *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. neotomae***

Dos 21 isolados de campo de *B. abortus* testados com este *primer*, 17 (90,5%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 895pb e 4 (9,5%) não apresentaram amplificação, entretanto nenhuma amostra obteve classificação errônea. Dos 30 isolados de campo de *B. canis* testados, todos (100%) apresentaram amplificação do fragmento esperado de 895pb para esta espécie.



Os fragmentos de 631-5pb, obtidos da cepa de referência de *B. ovis*, a partir dos *primers* Bov<sub>Omp</sub>, foi sequenciado e a análise de similaridade por BLAST revelou identidade de 100% com apenas uma região do cromossomo I das *B. ovis* disponíveis no GenBank, relacionada a uma proteína de ligadora de sulfato e tiosulfato, esta mesma sequência apresentou similaridades elevadas com duas regiões nas sequências das outras espécies de brucela, relacionadas a um transportador de sulfato ABC, equidistantes cerca de 250pb, confirmando a existência da deleção na *B. ovis*.

Por sua vez, a análise de similaridade por BLAST do sequenciamento do fragmento de 895pb amplificado da *B. melitensis* e da *B. canis* revelou identidade de 100% com apenas uma região do cromossomo I das *B. melitensis*, *B. canis*, *B. abortus* e *B. suis* disponíveis no GenBank, relacionada a um transportador de sulfato ABC, e esta mesma sequência apresentou similaridade elevada com duas regiões nas sequência da *B. ovis*, relacionadas a um transportador de sulfato ABC, equidistantes cerca de 250pb, confirmando a existência desta deleção na *B. ovis*.

O diagnóstico microbiológico e especialmente a tipificação das espécies de *Brucella* são procedimentos bastante difíceis e laboriosos, entretanto as PCRs padronizadas neste trabalho são bastante promissoras e certamente contribuirão tanto para o diagnóstico dos casos suspeitos, quanto na investigação epidemiológica dos casos humanos e animais.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- (i) Utilizando loci gênicos únicos, contendo sequências polimórficas de cada espécie, conseguimos desenhar *primers* espécie-específicos e padronizar PCRs para diferenciação de *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* e *B. ovis*;
- (ii) Segundo os testes de especificidade realizados frente às cepas de referência e isolados de campo testados, as PCRs padronizadas mostraram-se específicas.
- (iii) Testes com isolados de algumas outras espécies como *B. melitensis* e *B. ovis*, ainda são necessários, entretanto nós não dispomos de tais cepas.
- (iv) Os sequenciamentos dos fragmentos amplificados com os *primers* *BabS*, *BabI* e *BabAS*; *Bcan<sub>CapDF</sub>* e *Bcan<sub>CapDR</sub>*; *Bmel<sub>CoAF</sub>* e *Bmel<sub>CoAR</sub>*; *Bov<sub>OmpF</sub>* e *Bov<sub>OmpR</sub>*; *BOV<sub>TABCF</sub>* e *BOV<sub>TABCR</sub>*, comprovaram a existência de polimorfismos nas regiões estudadas e a especificidade dos *primers* desenhados.



## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; PIETZ, D. E. **Las técnicas de laboratorios en la brucelosis**. Geneva: OMS, 1976. 175 p.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM, 1999. p. 116-137.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4th ed. New York: Willey John & Sons, 1999.

BRICKER, B. J. Molecular diagnosis of animal brucellosis: a review of PCR-based assay approaches. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORYÓN, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. England: Horizon Bioscience, 2004. p. 25-51.

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

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

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 95-105, 2000.

CLAVAREAU, C.; WELLEMAN, V.; WALRAVENS, K.; TRYLAND, M.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; LETESSON, J. J. GODFROID, J. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). **Microbiology**, v. 144, p. 3267-3273, 1998.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; GRÉPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kda and 36 kda outer-membrane proteins of *Brucella*. **MICROBIOLOGY**, v. 141, p. 2111-2121, 1995.

CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N. DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORYÓN, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. 1ed. England: Horizon Bioscience, 2004. p. 1-23.

DELVECCHIO, V. G.; KAPATRAL, V.; REDKAR, R. J.; PATRA, G.; MUJER, C.; LOS, T.; IVANOVA, N.; ANDERSON, I.; BHATTACHARYYA, A.; LYKIDIS, A.; REZNIK, G.; JABLONSKI, L.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; SELKOV, E.; ELZER, P. H.; HAGIUS, S.; O'CALLAGHAN, D.; LETESSON, J. J.; HASELKORN, R.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *B. melitensis*. **PNAS.**, v. 99, n. 1, p. 443-448, 2002.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nuc Acid Res.**, v. 35, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FEKETE, A.; BANTLE, J. A.; HALLING, S. M.; STICH, R. W. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 23, p. 778-7783, 1992.

FERNANDEZ, S.; KATSUYAMA, A. M.; KASHIWABARA, A. Y.; MADEIRA, A. M.; DURHAM, A. M.; GRUBER, A. Characterization of SCAR markers of *Eimeria* spp. of domestic fowl and construction of a public relational database (The *Eimeria* SCARdb). **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, p. 183-188, 2004.

FICHT, T. A.; BEARDEN, S. W.; SOWA, B. A.; MARQUIS, H. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 7, p. 1135-1142, 1990.

FOSTER, J. T.; BECKSTROM-STERBERG, S. M.; PEARSON, T.; BECKSTROM-STERBERG, J. S.; CHAIN, P. S.; ROBERTO, F. F.; HNATH, J.; BRETTIN, T.; KEIM, P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the Genus *Brucella*. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 2864-2870, 2009.

GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 245, p. 79-84, 2005.

GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; VIZMANOS, J. L.; LÓPEZ-GOÑI, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *B. abortus* S19 and RB51 and *B. melitensis* Rev1. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 779-781, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

- 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 *B. abortus* and comparison to the highly similar genomes of *B. melitensis* and *B. suis*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.
- HALLING, S. M.; TATUM, F. M.; BRICKER, B. J. Sequence and characterization of an insertion sequence, *IS711*, from *B. ovis*. **Gene**, v. 133, p. 123-127, 1993.
- HALLING, S. M.; ZEHR, E. S. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 12, p. 6637-6640, 1990.
- HUBÁLEK, Z.; SCHOLZ, H. C.; SEDLÁČEK, I.; MELZER, F.; SANOGO, Y. O.; NESVADBOVÁ, J. Z. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, p. 679-687, 2007.
- JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochem Sci.**, v. 23, p. 403-405, 1998.
- KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS, S. A.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rRNA interspacer. **Vet. Res. Commun.**, v. 31, n. 8, p. 951-965, 2007.
- LASSMANN, T.; SONNHAMMER, E. Kalign – an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. **BMC Bioinformatics.**, v. 6, p. 298, 2005.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; BLASCO, J. M.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A. C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M. I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species and of the vaccine strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 10, p. 3484-3487, 2008.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. *Brucella: molecular and cellular biology*. Wymondham Eds. Horizon Bioscience, UK: 2004. 432 p.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics.**, v. 20, n. 15, p. 2471-2472, 2004.
- MINHARRO, S.; MOL, J. P. S.; PAULETTI, R. B.; DORNELES, E. S.; POESTER, F. P.; DASSO, M. G.; SCARCELLI, E.; SOARES FILHO, P. M.; HEINEMMAN, M. B.; SANTOS, R. L.; LAGE, A. P. (2009). Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de

bovinos no Brasil. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. Belo Horizonte, 2009. **Ciência Animal Brasileira**, supl. 1, p. 442-446.

MORGAN, U. M.; O'BRIEN, P. A.; THOMPSON, R. C. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD PCR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, p. 103-108, 1996.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **J Mol Biol.**, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000.

O'HARA, M. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Restriction endonuclease analyses of *B. ovis* and other *Brucella* species. **Vet. Microbiol.**, v. 10, p. 425-429, 1985.

OCAMPO-SOSA, A. A.; AGÜERO-BALBÍN, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *B. abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. **Vet. Mic.**, v. 110, p. 41-51, 2005.

OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; SRI WIDADA, J.; BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J. P. Identification and sequence analysis of *IS6501*, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of *IS6501* copies. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 3265-3273, 1993.

PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; READ, T. D.; DODSON, R. J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L. M.; BEANAN, M. J.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DURKIN, A. S.; KOLONAY, J. F.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S. E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S. R.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; HOOVER, D. L.; LINDLER, L. E.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M.; FRASER, C. M. The *B. suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbiots. **PNAS.**, v. 99, n. 20, p. 13148-13153, 2002.

RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J. D.; GLOVER, D. A.; SPLITTER, G. A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 15, p. 5040-5051, 2004.

RATUSHNA, V. G.; STURGILL, D. M.; RAMAMOORTHY, S.; REICHOW, S. A.; HE, Y.; LATHIGRA, R.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M.; GIBAS, C. J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp.. **BMC Microbiol.**, v. 6, n. 13, p. 1-20, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol.**, v. 132, p. 365-86, 2000.

RYAN, J.; GLARUM, J. F. **Biosecurity and bioterrorism: containing and preventing biological threats**. Burlington, MA: Elsevier, 2008

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 58, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 60, p. 801-808, 2010.

TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; JERSEK, B.; HERMAN, L. M. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 69-80, 2000.

TSOLIS, R. M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R. L.; SANGARI, F. J.; LOBO, J. M.; DE JONG, M. F.; REN, Q.; MYERS, G.; BRINKAC, L. M.; NELSON, W. C.; DEBOY, R. T.; ANGIUOLI, S.; KHOURI, H.; DIMITROV, G.; ROBINSON, J. R.; MULLIGAN, S.; WALKER, R. L.; ELZER, P. E.; HASSAN, K. A.; PAULSEN, I. T. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. **PLoS One.**, v. 4, n. 5, p. e5519, 2009.

VERGER, J. M.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; LEFÈVRE, M.; AGERON, E.; GRIMONT, F. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 797-799, 2000.

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.

VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A.; GRAYON, M. Taxonomy of the genus *Brucella*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 138, p. 235-238, 1987.

VIZCAÍNO, N.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; CLOECKAERT, A.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7 Kb inversion in *B. cetaceae* and a 15.1 Kb genomic island, absent from *B. ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. **Microbes and Infect.**, v. 6, p. 821-834, 2004.

VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; VERGER, J.; GRAYON, M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. **Microbes and Infect.**, v. 2, p. 1089-1100, 2000.

VIZCAÍNO, N.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A. DNA polymorphism at the *omp31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *B. abortus*, and other species-specific markers. **Microbiology**, v. 143, p. 2913-2921, 1997.

**ANEXOS**



## Anexo 1 – Resultados das PCRs padronizadas nas amostras de referência de *Brucella*

Amostras	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>1</sub> AS <sub>1</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B ab 1 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 1 (2308) USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 2 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 3 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	1 (572pb)*	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 4 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 5 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 6 USP	1 (954 pb)	o*	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 9 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B mel 1 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	1 (572pb)*	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (600p)	1 (600p)	1 (714_5pb)	1 (714_5pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B mel 2 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (600p)	1 (600p)	1 (714_5pb)	1 (714_5pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B mel 3 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (600p)	1 (600p)	1 (714_5pb)	1 (714_5pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B sui 1 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B sui 2 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	2 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B sui 3 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	3 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B sui 4 USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	1 (318 pb)*	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	4 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B neo USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	5 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B ov USP	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	o	o	1 (583pb)	1 (583pb)	1 (631pb)	1 (631pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	6 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B can USP	1 (596 pb)	1 (954 pb)*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	o*	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (600p)*	1 (821 pb)	1 (714_5pb)*	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)
B can Fiocruz	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821 pb)	1 (856_7pb)	1 (856_7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 2 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella abortus*

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B ab 1 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	o*	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 2 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 3 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 4 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 5 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 6 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 7 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 9 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 10 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 11 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 12 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 13 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (825 pb)	o*	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 14 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 15 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 16 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 17 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 18 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 19 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 20 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 21 Biol	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)
B ab 22 Biol	1 (954 pb)	o*	o	NR	o	NR	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (825 pb)	1 (825 pb)	1 (410pb)	1 (410pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

### Anexo 3 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella suis*

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>2</sub> AS <sub>1</sub>	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
ial 84	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (825 pb)	NR	1 (410pb)	NR
ial 85	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (825 pb)	NR	1 (410pb)	NR
ial 86	1 (954 pb)	1 (954 pb)	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (825 pb)	NR	1 (410pb)	NR
ial 87	1 (954 pb)	o*	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (825 pb)	NR	1 (410pb)	NR
ial 88	1 (954 pb)	o*	o	o	1 (572 pb)	1 (572 pb)	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (825 pb)	NR	1 (410pb)	NR

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis*

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S,AS,I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 1	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 2	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 3	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 4	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 5	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 6	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 7	1 (596 pb)	1 (954 pb)*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	1 (572pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821 pb)	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 8	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 9	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 11	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 12	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 13	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 14	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 15	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 16	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 17	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 18	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 19	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 20	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 21	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 22	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 23	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 24	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 25	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 26	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 27	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 28	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 29	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 30	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 31	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 32	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 33	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 34	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 35	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	o*
B. can 36	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 37	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 38	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 39	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 40	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 41	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

#### Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 42	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 43	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 44	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 45	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 46	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 47	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 48	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 49	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 50	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 51	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 52	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 53	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 54	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 55	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 56	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 57	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)
B. can 58	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 59	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 60	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 61	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1(856_7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 62	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 63	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 64	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 65	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 66	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 67	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 68	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 69	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 70	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 71	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 72	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 73	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 74	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 75	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 76	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 77	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 78	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 79	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 80	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 81	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

#### Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 82	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 83	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 84	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 85	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 86	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 87	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 88	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 89	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 90	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 91	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 92	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 93	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 94	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 95	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 96	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 97	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 98	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 99	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 100	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 101	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado



## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 102	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 103	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 104	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 105	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 106	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 107	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 108	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 109	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 110	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 111	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 112	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 113	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 114	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 115	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 116	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 117	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 118	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 119	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 120	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 121	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 122	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 123	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 124	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 125	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 126	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 127	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 128	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 129	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 130	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 131	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 132	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 133	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 134	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 135	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 136	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 137	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 138	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 139	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 140	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 141	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 142	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 143	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 144	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 145	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 146	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 147	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 148	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 149	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 150	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 151	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 152	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 153	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 154	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 155	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 156	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	1 (572pb)	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 157	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 158	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 159	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	o*	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (821 pb)	o*	1(856_7pb)	o*
B. can 160	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 161	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S,AS,I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 162	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 163	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 164	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 165	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 166	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 167	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 168	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 169	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 170	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 171	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 172	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 173	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 174	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 175	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 177	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 178	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 179	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 180	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 181	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 182	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	o*	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (821 pb)	o*	1(856_7pb)	o*

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado

## Anexo 4 – Resultados das PCRs padronizadas nos isolados de campo de *Brucella canis* (continuação)

Amostra	Primer B. can Cap D		Primer B. can Acet		Primer B. casu LacB		Primer B. ov OMP		Primer B. ov Tabc		Primer B. mel OMP31		Primer B. mel CoA		Primer B. ab S <sub>AS</sub> I	
	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
B. can 183	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 184	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 185	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 186	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	o*	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (821 pb)	o*	1(856_7pb)	o*
B. can 187	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 188	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 189	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 190	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 191	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 192	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 193	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 194	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 195	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 196	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 197	1 (596 pb)	o*	1 (318 pb)	o*	1 (572 pb)	1 (572pb)	o	o	1 (895pb)	o*	1 (832pb)	o*	1 (821 pb)	o*	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 198	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 199	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 200	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 201	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 202	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 203	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	o	1 (895pb)	1 (895pb)	1 (832pb)	1 (832pb)	1 (821 pb)	1 (821pb)	1(856_7pb)	1 (856-7pb)
B. can 204	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 205	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 206	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR
B. can 207	1 (596 pb)	1 (596 pb)	1 (318 pb)	1 (318 pb)	1 (572 pb)	NR	o	NR	1 (895pb)	NR	1 (832pb)	NR	1 (821 pb)	NR	1(856_7pb)	NR

o ausência de amplificação; 1 presença de amplificação (Tamanho em pb do amplificado); \* representam resultados diferentes do esperado para o primer analisado