

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Identificação de *Brucella* sp. isoladas no Brasil por Bruce-Ladder e estudo da susceptibilidade de cepas de *B. abortus* e *B. canis* à rifampicina**

Ester Souza Lopes  
Bióloga - UNISINOS  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

Tese de Doutorado

Orientador: Marisa da Costa

Março de 2014, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Identificação de *Brucella* sp. isoladas no Brasil por Bruce-Ladder e estudo da susceptibilidade de cepas de *B. abortus* e *B. canis* à rifampicina**

Ester Souza Lopes  
Bióloga - UNISINOS  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Março de 2014, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### CIP - Catalogação na Publicação

Souza Lopes, Ester

Identificação de Brucella sp. isoladas no Brasil por Bruce-Ladder e estudo da susceptibilidade de cepas de B. abortus e B. canis / Ester Souza Lopes. - 2014.  
92 f.

Orientadora: Marisa da Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Brucella. 2. Identificação. 3. Resistência. 4. Bruce-Ladder. I. da Costa, Marisa, orient. II. Título.

ESTER SOUZA LOPES  
BIOLÓGA  
UNISINOS

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
Para obtenção do Grau de

### DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 17/03/2014  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 04/11/2014  
Por:

*Marisa da Costa*  
MARISA DA COSTA  
Orientador

*Sueli Teresinha Van der Sand*  
SUELI TERESINHA VAN DER SAND  
Coordenadora do PPGMAA

*Ana Paula Guedes Frazzon*  
ANA PAULA GUEDES FRAZZON  
UFRGS

*Marisa Ribeiro de Itapeema Cardoso*  
MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA CARDOSO  
UFRGS

*Mercedes Passos Geimba*  
MERCEDES PASSOS GEIMBA  
DEMIP/UFRGS

*Maria Cristina Faccioni Heuser*  
MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER  
Diretora do ICBS - UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela força, persistência e iluminação em todas as etapas da minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro individual.

À minha orientadora, Dra. Marisa da Costa um agradecimento especial pela atenção, estímulo, compreensão das minhas dificuldades pessoais e científicas, e amizade.

Ao Alexandre Karnopp pelo apoio, amor, incentivo, compreensão e companheirismo durante toda a fase de execução desse projeto, com suporte emocional e paciência nos meus dias de muita ansiedade e desânimo.

Às minhas pupilas, bolsistas de iniciação científica, Flávia Vargas, Verônica Machado e Cristina Tonial Simões pela dedicação e pelo aprendizado que suas co-orientações me proporcionaram.

Aos colegas do Laboratório 165 do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Jozi Mello, Renê Darela Blazius e Gabriela Albiero pela amizade e auxílio.

A todos os professores do PPGMAA pela fundamental contribuição ao meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores membros da banca examinadora, Dra. Marisa Cardoso, Dra. Ana Paula Guedes Frazzon e Dra. Mercedes Geimba pela importante contribuição nesse trabalho.

# Identificação de *Brucella* sp. isoladas no Brasil por Bruce-Ladder e estudo da susceptibilidade de cepas de *B. abortus* e *B. canis* à rifampicina

Autor: Ma. Ester Souza Lopes

Orientador: Dra. Marisa da Costa

## RESUMO<sup>1</sup>

*Brucella* sp. são causadoras de brucelose, zoonose de importância mundial, sendo sua identificação muito importante para programas de controle e erradicação ou para se realizar um rastreamento epidemiológico. Em caso de brucelose humana, o tratamento é feito com uma combinação de dois antimicrobianos, sendo a rifampicina uma das possibilidades nesta associação e frequentemente utilizada; porém há relatos de casos de resistência com este antimicrobiano. Este estudo teve como objetivos: (i) tipificar a coleção de cepas de *Brucella* sp. pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Animal, DeMIP, ICBS, por Bruce-Ladder; (ii) testar a susceptibilidade antimicrobiana para rifampicina pelos métodos E-test e microdiluição em caldo; (iii) realizar a avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo; (iv) investigar os eventos moleculares que levam ao desenvolvimento do fenótipo de resistência através da análise do gene *rpoB*; (v) detectar a presença do gene *bepC*. A PCR Bruce-Ladder confirmou a identificação de todas as cepas de referência e de campo testadas e classificou todas as cepas de campo, isoladas de bovinos, como *B. abortus*. Houve divergência na Concentração Inibitória Mínima de microdiluição em caldo e E-test em 21% das cepas analisadas. Oito das 52 cepas testadas apresentaram susceptibilidade reduzida para rifampicina pelo método de diluição em caldo. Observamos redução da CIM na presença de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (ccc) das cepas com susceptibilidade reduzida a rifampicina indicando uma provável ação de bomba de efluxo nesta resistência. Encontramos duas mutações no gene *rpoB* que não estão envolvidas com o fenótipo de resistência. O gene *bepC* foi detectado em 100% das cepas testadas (susceptíveis e resistentes à rifampicina) indicando que não está relacionado ao fenótipo de resistência observado.

---

Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia Molecular de Procariotos e Eucariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93p.) Março, 2014.

## Identification of *Brucella* spp. isolated in Brazil by Bruce-Ladder and study of susceptibility of strains of *B. abortus* and *B. canis* rifampicin

Author: Ma. Ester Souza Lopes

Advisor: Dra. Marisa da Costa

### ABSTRACT<sup>2</sup>

*Brucella* sp. are the causative agent of brucellosis, a zoonotic disease of global importance. Their correct identification is very important to help the control and eradication programs, or to carry out an epidemiological tracing. In the case of human brucellosis, treatment is done with a combination of two antimicrobials, rifampin being one of the possibilities in this association and commonly used; however there are case reports of resistance to this antibiotic. This study aims: (i) typing the *Brucella* strains collection belonging to the Laboratory of Animal Bacteriology, DeMIP, ICBS, by Bruce-Ladder; (ii) test its antimicrobial susceptibility to rifampin by E-test and microdilution broth methods; (iii) evaluate the phenotype of super expression of efflux pump; (iv) investigate the molecular events that can lead to the development of resistance analyzing the *rpoB* gene; and (v) detect the presence of the *bepC* gene. The Bruce-Ladder PCR confirmed the identification of all the reference and field strains tested and classified all strains isolated from cattle, as *B. abortus*. There was a divergent result in the minimum inhibitory concentration (MIC) between the microdilution broth test and E-test in 21% of the strains examined. Eight of 52 strains tested showed reduced susceptibility to rifampin by the broth dilution method. It was observed MIC reduction in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazonate with the strains with reduced susceptibility to rifampin, indicating a probable action of an efflux pump in this phenotype. We found two gene mutations in the *rpoB* gene who aren't involved with the resistance phenotype. The *bepC* gene was detected in 100% of the strains tested (susceptible and resistant to rifampicin) indicating that is not probably related to the phenotype of resistance observed.

---

<sup>2</sup> Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Molecular Microbiology of Procarotes and Eucaryotes, Health Basic Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (93p.) March, 2014.

## SUMÁRIO

	Pág.
Relação de tabelas.....	VII
Relação de figuras.....	VIII
Relação de abreviaturas e símbolos.....	IX
1. Introdução.....	01
2. Revisão bibliográfica.....	03
2.1. Agente etiológico.....	03
2.2. Brucelose humana.....	04
2.2.1. Epidemiologia e distribuição geográfica.....	05
2.2.2. Transmissão.....	06
2.2.3. Manifestações clínicas.....	08
2.2.4. Diagnóstico.....	10
2.2.5. Tratamento.....	11
2.2.5.1. Rifampicina.....	12
2.3. Resistência.....	13
2.3.1. Testes de susceptibilidade antimicrobiana.....	13
2.3.2. Gene <i>rpoB</i> .....	14
2.3.3. Gene <i>bepC</i> .....	15
2.4. Identificação molecular de <i>Brucella</i> sp.....	15
2.4.1. PCR multiplex Bruce-Ladder.....	16
3. Artigo 1: Use of modified Bruce-Ladder PCR for identification of <i>Brucella</i> sp. strains isolated in Brazil between 1976 and 2013.....	18
4 Artigo 2: Isolation and identification of <i>Brucella abortus</i> of bovine fetuses from the midwest region of Brazil – a case report.....	30
5. Artigo 3: Antimicrobial susceptibility testing and molecular characterization of rifampicin resistance in <i>B. abortus</i> and <i>B. canis</i> .....	41
6. Resultados e discussão geral .....	57
7. Conclusões .....	60
8. Referências.....	61
9. Apêndices .....	74



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Dados das cepas de <i>B. abortus</i> isoladas e identificadas a partir de fetos abortados em propriedades da região centro-oeste do Brasil.....	74
<b>Tabela 2.</b> Cepas de <i>B. abortus</i> e <i>B. canis</i> testadas e seus perfis de susceptibilidade a rifampicina por E-test e microdiluição em caldo.....	75
<b>Tabela 3.</b> Resultados do teste de avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo em cepas de <i>B. abortus</i> com perfil de susceptibilidade reduzida no teste de susceptibilidade antimicrobiana para rifampicina em microdiluição em caldo.....	77
<b>Tabela 4.</b> Cepas utilizadas no experimento Bruce-Ladder modificado.....	78

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Imagem da tela do programa Mega 5.05 utilizado para identificação de mutações nas sequencias de DNA das regiões hipervariáveis do gene <i>rpoB</i> .....	81

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cccp: carbonil cianida m-clorofenilhidrazona

CIM: concentração inibitória mínima

DNA: ácido desoxirribonucleico

Kb: quilobase

pb: pares de base

PCR: reação da polimerase em cadeia

RIF: rifampicina

RNA: ácido ribonucleico

RNAP: RNA polimerase DNA dependente

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Brucella* são causadoras de brucelose, uma zoonose de importância mundial, portanto a detecção desta bactéria nos animais é essencial para prevenção da doença em humanos. No Brasil, existem poucos estudos sobre a identificação de espécies de *Brucella*, sendo que a maioria dos estudos sobre brucelose tanto animal quanto humana são baseados em testes serológicos e não na identificação do agente patogénico. A dificuldade de identificação, principalmente a nível biovar, está ligada à ausência de um laboratório especializado no Brasil que aplique os testes necessários para identificação de *Brucella* sp., pois alguns são difíceis de executar (por exemplo, a produção de soros monoespecíficos e cultura de fago). A identificação do gênero não é suficiente para programas de erradicação ou para se realizar um rastreamento epidemiológico.

Em caso de brucelose humana, o tratamento é feito com uma combinação de dois antimicrobianos, sendo a rifampicina um importante antimicrobiano utilizado, porém há relatos de casos de resistência. A resistência aos antimicrobianos é um problema global e emergente e estudos com o objetivo de identificar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Brucella* sp, são escassos. Conhecer os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência é de grande importância, pois possibilita o desenvolvimento de estratégias que podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência. Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são

de grande importância para o entendimento dos fatores envolvidos e para se desenvolver uma abordagem eficaz para restaurar a susceptibilidade de cepas resistentes às drogas.

Este estudo teve como objetivos: (i) tipificar a coleção de cepas de *Brucella* sp. da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Animal – UFRGS e de cepas isoladas ao longo da preparação do doutorado, através da aplicação do método Bruce-Ladder modificado; (ii) testar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *B. abortus* e *B. canis* da coleção do DeMIP - UFRGS, para o antimicrobiano rifampicina através das técnicas de E-test e de microdiluição em caldo com o objetivo de comparar os resultados obtidos em ambos os testes; (iii) realizar a avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo testando a atividade de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (cccP) na possibilidade de redução da CIM à RIF em cepas de *Brucella*, com fenótipo de susceptibilidade diminuída, através do método de microdiluição em caldo; (iv) investigar os eventos moleculares que podem levar ao desenvolvimento do fenótipo rifampicina-resistente em *Brucella* sp. através da análise do gene *rpoB*; (v) detectar a presença do gene *bepC*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Agente Etiológico:

*Brucella* sp. são os agentes causadores da brucelose, doença que afeta diversas espécies animais e é transmitida aos seres humanos de várias maneiras (Cassataro *et al.*, 2004; Delpino *et al.*, 2004). São encontradas na maioria dos continentes, inclusive em ecossistemas marinhos (Cloeckaert *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004).

O gênero é composto por bactérias Gram-negativas na forma de pequenos cocobacilos, que aparecem normalmente isolados ou em pares, não excedem o tamanho de 2µm, catalase positivos e normalmente oxidase positivos, produzem H<sub>2</sub>S, não produzem indol, são aeróbios e podem necessitar a adição de CO<sub>2</sub> no cultivo *in vitro* (principalmente em isolamentos primários) (Alton *et al.*, 1988). Embora descritos como não-móveis, possuem todos os genes necessários para montar um flagelo funcional, exceto o sistema quimiotático (Fretin *et al.*, 2005). São patógenos intracelulares facultativos (Lecaróz *et al.*, 2006).

Análises de sequências genéticas do rRNA 16S posicionam as brucelas no subgrupo alfa-2 de Proteobactérias, apresentando relação com patógenos de plantas e simbioses tais como *Rhizobium* sp. e *Agrobacterium* sp., parasitas intracelulares como *Bartonella* sp. e *Rickettsia* sp. e bactérias oportunistas e de vida livre como *Ochrobactrum* sp. e *Rhodobacter* sp. (Jumas-

Bilak *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2000; Gándara *et al.*, 2001; López-Goñi & Moriyón, 2004; Alvarez *et al.*, 2006; Fugier *et al.*, 2007).

Atualmente, existem 10 espécies reconhecidas de *Brucella*, com base nas preferências de hospedeiro, diferenças fenotípicas e patogenia: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (cães), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos, renas e lebres), *B. microti* (pequenos roedores do leste europeu), *B. pinnipidialis* (pinípedes), *B. ceti* (cetáceos) e *B. inopinata* (associada à infecção humana) (Corbel and Banai, 2005; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008, De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2010). Entre estas espécies, seis são patogênicas para o homem: *B. abortus*, *B. canis*, *B. inopinata*, *B. melitensis*, *B. pinnipidialis* e *B. suis*. (Clockaert *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Fugier *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008).

Classicamente, isolados de *Brucella* são divididos em espécies por um procedimento de biotipificação que avalia uma série de propriedades relacionadas à fisiologia, fenótipo, fagotipificação e propriedades antigênicas. Algumas espécies são divididas em biovares ou biotipos por aproximadamente 25 características fenotípicas, em que *B. abortus* tem sido dividida em sete biovares, *B. melitensis* em três e *B. suis* em cinco (Alton *et al.*, 1988; Bricker, 2002; Corbel and Banai, 2005). As outras espécies não possuem biovares. Tais análises estão sujeitas a diferentes interpretações, expõem o laboratorista a risco de contaminação e, por isso, devem ser executadas por técnicos qualificados (García-Yoldi *et al.*, 2006).

## **2.2. Brucelose Humana:**

### 2.2.1. Epidemiologia e distribuição geográfica:

A distribuição geográfica da brucelose sofre constantes alterações, com focos emergentes ou re-emergentes ao longo dos anos devido a diversas razões sanitárias, socioeconômicas e políticas, em conjunto com aumento de viagens internacionais (Pappas *et al.*, 2006a). A doença ocorre em todo o mundo, exceto nos países onde a brucelose bovina foi erradicada, ou seja, há ausência de quaisquer casos relatados pelo menos nos últimos cinco anos (Seleem *et al.*, 2010).

Cada espécie tem características epidemiológicas diferentes. *Brucella abortus* é a forma mais difundida, presente no rebanho bovino. Em humanos, *B. melitensis* é a mais importante clinicamente, porém a presença desta espécie nunca foi encontrada no Brasil, sendo a brucelose causada por *B. abortus* a mais comum. Portanto esta zoonose está ligada principalmente às atividades profissionais que lidam com bovinos (Santos Neto *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002; Dragosavac *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2008; Brasil, 2010).

Embora na maioria dos países, a brucelose humana seja uma doença de notificação obrigatória, imagina-se que os números relatados e oficiais constituem apenas uma fração verdadeira da incidência da doença. Isso devido ao diagnóstico equivocado, à subnotificação, à falta de instalações laboratoriais adequadas; bem como pela pouca cooperação e troca de informações entre profissionais e serviços de saúde pública; sendo que a taxa estimada varia amplamente, de menos de um a mais de 160 por 100.000 habitantes (Taleski *et*



*al.*, 2002; Nimri, 2003; Afifi *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006a; Mantur *et al.*, 2007).

No Brasil não é obrigatória a notificação de casos isolados de brucelose humana. Se ocorrer em surtos, a doença deve ser notificada e realizada investigação epidemiológica para adoção das medidas de controle e prevenção necessárias (Brasil, 2010).

A brucelose é uma doença de risco ocupacional para fazendeiros, veterinários, trabalhadores de abatedouros, laboratoristas e outros que trabalham com animais e/ou que consomem seus produtos não processados ou maturados. Portanto a prevalência de brucelose em humanos depende de vários fatores como hábitos alimentares, métodos de processamento de leite e derivados, práticas de manejo e higiene do ambiente (Alton & Forsyth, 1996; Pappas *et al.*, 2006a; Gwida *et al.*, 2010; D'Anastasio *et al.*, 2011).

### **2.2.2. Transmissão:**

Espécies de *Brucella* podem sobreviver por longos períodos em poeira, esterco, água, chorume, fetos abortados, solo, carnes e produtos lácteos. A dose infecciosa é muito baixa, sendo 10 a 100 micro-organismos suficientes para causar uma infecção debilitante em humanos por várias semanas (Pappas *et al.*, 2006b). A brucelose humana é transmitida por inalação, contato com as secreções do animal infectado, consumo de produtos lácteos não pasteurizados e produtos cárneos não maturados e mal cozidos, estabelecendo-se via cutânea, respiratória ou pela rota gastrointestinal (Alton &

Forsyth, 1996; Pappas *et al.*, 2006a; Gwida *et al.*, 2010; D'Anastasio *et al.*, 2011).

A transmissão sexual da brucelose em humanos tem sido relatada (Lindberg & Larsson, 1991; Ruben *et al.*, 1991; Thalhammer *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2007; Meltzer *et al.*, 2010). O fato de ocorrerem poucos relatos de transmissão sexual em humanos, apesar da alta incidência de envolvimento genital na infecção nos outros animais tem levantado a suspeita de que há subnotificação (Meltzer *et al.*, 2010). Em áreas de alta endemicidade, casos em famílias são comuns e a taxa de casos secundários entre familiares de pacientes pode chegar a 50% (Gotuzzo *et al.*, 1987). No entanto, devido à exposição contínua a alimentos contaminados e do período de incubação altamente variável da brucelose, é impossível distinguir transmissão sexual em áreas endêmicas. Mães que estão amamentando também podem transmitir a infecção para seus filhos através do aleitamento materno (Carrera *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007).

A brucelose continua a ser a infecção bacteriana associada a laboratório mais frequentemente relatada (Yagupsky *et al.*, 2000; Robichaud *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, a infecção por *Brucella* é uma das mais comuns infecções de laboratório, representando 24% das infecções bacterianas e 11% das mortes devido à infecção de laboratório. Os aerossóis são a principal fonte de transmissão, mas a bactéria também pode ser transmitida através de contato direto. No entanto, em muitos casos, não foi possível determinar com precisão o mecanismo de transmissão (Singh, 2009).

Como a brucelose é uma zoonose derivada do contato direto ou indireto com animais infectados, a incidência em humanos varia de acordo com a

densidade do rebanho bovino, o nível sócio econômico e os hábitos alimentares. A sua distribuição acompanha a criação e o comércio de gado. Portanto, a prevenção da brucelose no homem depende, sobretudo do controle ou erradicação da doença nos animais. Outras medidas importantes são os cuidados de higiene, para limitar os riscos de exposição de algumas atividades ocupacionais e a pasteurização ou fervura dos produtos lácteos e outros alimentos de risco (Cook *et al.*, 2002; Lawinsky *et al.*, 2010; Seleem *et al.*, 2010).

### **2.2.3. Manifestações clínicas:**

Embora a brucelose raramente seja fatal em seres humanos, pode ser severamente debilitante e incapacitante, e por ser uma doença febril pode ser confundida com outras doenças, tanto infecciosas como não infecciosas, incluindo febre entérica, malária, febre reumática, tuberculose, colecistite, tromboflebite, infecção fúngica, doença auto-imune e tumores (Roushan *et al.*, 2004; Pappas *et al.*, 2005; Mantur *et al.*, 2007). Em humanos, as manifestações clínicas da brucelose são responsáveis por incapacidade parcial ou total para o trabalho. Trata-se de doença de caráter predominantemente ocupacional, citada na lista de doenças relacionadas ao trabalho, na Portaria nº 1.339/1999 do Ministério da Saúde (Brucelose A23) e responsável por incapacidade para o trabalho ou diminuição do rendimento (Lawinsky *et al.*, 2010).

A brucelose humana tem um amplo espectro de manifestações, sendo que suas características clínicas dependem da fase da doença e dos órgãos e sistemas envolvidos. A infecção pode comprometer o sistema nervoso central e

periférico, gastrointestinal, hepatobiliar, geniturinário, músculo-esquelético, cardiovascular e sistemas tegumentares (Acha & Szyfres, 2003; Sohn *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2007). A versatilidade do quadro clínico muitas vezes resulta no diagnóstico errado ou atrasos de diagnóstico, o que pode aumentar as taxas de mortalidade e de complicações (Dahouk *et al.*, 2007).

O período de incubação da brucelose normalmente é de 1-3 semanas, mas pode ser de vários meses antes de mostrar sinais de infecção. A espécie *B. melitensis* está associada com infecção aguda enquanto que as infecções com outras espécies são geralmente subagudas e prolongadas (Mantur *et al.*, 2007). Sintomas mais comuns da brucelose incluem febre ondulante em que a temperatura pode variar desde 37,8C° na parte da manhã a 40,8C° na parte da tarde, sudorese noturna com odor peculiar, calafrios, fraqueza, insônia, mal-estar, anorexia, artralgia, cefaleia, constipação, impotência sexual, nervosismo e depressão (Acha & Szyfres, 2003).

Abortos espontâneos, principalmente nos primeiro e segundo trimestres de gravidez, são vistos em mulheres grávidas infectadas com *Brucella* (Khan *et al.*, 2001). Apesar de complicação rara, a endocardite por *Brucella* (<2% dos casos) é mais comumente associada com a infecção por *B. melitensis* e é o caso mais complicado e grave, sendo responsável por pelo menos 80% das mortes devido à brucelose (Reguera *et al.*, 2003).

A falta de uma terapia apropriada durante a fase aguda pode resultar na localização de brucelas em vários tecidos e órgãos e levar à doença subaguda ou crônica, que é mais difícil de tratar (Young, 1995). A doença tende a tornar-se crônica e persistente, tornando-se uma doença granulomatosa capaz de

afetar qualquer órgão (Smits *et al.*, 2003; Roushan *et al.*, 2004; Pappas *et al.*, 2005).

Apesar de diagnóstico precoce e tratamento, cerca de 10 a 30% dos pacientes desenvolvem doença crônica, caracterizada por apresentações clínicas atípicas, síndrome de fadiga crônica e recaídas (Pappas *et al.*, 2005; Skendros *et al.*, 2006).

#### **2.2.4. Diagnóstico:**

Testes sorológicos são frequentemente usados como métodos de diagnóstico rápido para a detecção da resposta imunitária de brucelose, devido a sua simplicidade de execução e interpretação (Mediavilla *et al.*, 2003). No Brasil, o método laboratorial utilizado na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) é o teste sorológico por reação de aglutinação rápida com antígenos de *B. abortus*, conhecido como Rosa Bengala (Santana-Porto *et al.*, 2008; Brasil, 2010).

O isolamento da bactéria é o método mais específico, e embora seja mais complexo na realização por ser demorado e exigir recursos laboratoriais nem sempre disponíveis. É considerado o “padrão ouro”, sendo muito importante na confirmação de uma suspeita clínica, no estudo da epidemiologia da doença e também como confirmação dos resultados encontrados nos testes sorológicos. Isso porque são observadas reações cruzadas com outras bactérias Gram negativas, sendo *Yersinia enterocolitica* a mais frequentemente envolvida (Mediavilla *et al.*, 2003, Bounaadja *et al.*, 2009).

A confirmação diagnóstica se faz através da cultura de sangue, medula óssea, tecidos ou secreções do paciente, sendo normalmente a hemocultura o método de escolha, porém é frequentemente dificultado pela baixa sensibilidade e atraso no crescimento em função da baixa concentração de bactérias normalmente encontradas em pacientes com bacteremia por *Brucella* sp. (Mediavilla *et al.*, 2003; McCabe *apud* Mantur *et al.*, 2008; Brasil, 2010). Além disso, os resultados não estão disponíveis imediatamente, pois o tempo mínimo para isolamento e identificação da bactéria é de 8 dias considerando um crescimento ótimo de 48 horas, mas períodos de até 30 dias podem ser necessários, considerando o uso de metodologia de identificação clássica (fisiologia, bioquímica, sorologia). Além de ser um processo lento, a bacteriologia também requer técnicos experientes, pois está associada ao risco de infecções adquiridas em laboratório, exigindo pessoas bem treinadas e instalações adequadas para o trabalho com esses micro-organismos (Alton *et al.*, 1988; Bricker, 2002; Navarro *et al.*, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza como critérios para o diagnóstico de brucelose humana: sorologia positiva e, pelo menos, dois sintomas/sinais do quadro clínico e história epidemiológica compatível (Brasil, 2010).

#### **2.2.5. Tratamento:**

O êxito no tratamento de qualquer doença infecciosa baseia-se, principalmente, em diagnóstico precoce e preciso, porém a ausência de sinais ou sintomas específicos torna difícil o diagnóstico clínico da brucelose (Solera,

2010). A terapia antimicrobiana é útil para encurtar o curso natural da doença, reduzindo a incidência de complicações e prevenção de recidivas. Antimicrobianos adequados devem ter alta atividade *in vitro* e boa penetração intracelular (Solera *et al.*, 1997), pois o ambiente ácido do vacúolo contendo *Brucella* serve como um neutralizador de antimicrobianos. Assim, os antimicrobianos com reconhecida atividade *in vitro* contra *Brucella* sp., podem mostrar uma atividade intracelular atenuada *in vivo*, necessitando de administração combinada e prolongada (Köhler *et al.*, 2002).

De acordo com a OMS, o tratamento da brucelose pode ser feito com as tetraciclínas (principalmente doxiciclina e minociclina), os aminoglicosídeos, a rifampicina, o cotrimoxazol, as quinolonas e as cefalosporinas de terceira geração. A escolha da associação entre antimicrobianos vai depender das particularidades do paciente, como idade, gravidez e gravidade do estado clínico (Solera, 2010; WHO, 2014).

No Brasil, o tratamento da brucelose é feito com uma combinação de dois antimicrobianos, sendo a droga de escolha a doxiciclina (200mg/dia), em combinação com a rifampicina (600 a 900mg/dia), durante 6 semanas. Não é recomendado o uso de doxiciclina em menores de 7 anos. Sulfametoxazol e trimetoprim podem ser associados à gentamicina, nesses casos (Brasil, 2010).

#### 2.2.5.1. Rifampicina:

A rifampicina é um potente antimicrobiano no tratamento de infecções por *Brucella* e é amplamente aceito na terapia de primeira linha; é o único antimicrobiano com atividade aumentada em condições ambientais ácidas,

além de ter uma boa penetração intracelular e sinergismo evidente em terapias combinadas (Colmenero *et al.*, 1994; Gür *et al.*, 1999; Yumuk & Dundar, 2005; WHO, 2006;).

Apesar dos isolados de *Brucella* serem geralmente considerados sensíveis aos antimicrobianos recomendados pela Organização Mundial da Saúde, casos esporádicos de resistência a antimicrobianos, incluindo rifampicina, têm sido relatados, sendo desvantagem o rápido aparecimento de cepas resistentes com seu uso (Baykam *et al.*, 2004; López-Merino *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2008; Valdezate *et al.*, 2010; Magalhães Neto *et al.*, 2013- artigo submetido).

### **2.3. Resistência:**

#### **2.3.1. Testes de susceptibilidade antimicrobiana:**

Testes de susceptibilidade antimicrobiana para *Brucella* sp. não são geralmente recomendados para rotina de laboratórios de microbiologia pela baixa frequência de resistência relatada para cada espécie, exceto em risco de vida, tais como endocardite e meningite brucélica, no caso de falha no tratamento e recidivas (King, 2001; Dizbay *et al.*, 2007). Outro problema é a falta de padronização para estes testes. O “Clinical and Laboratory Standards Institute” lançou os primeiros padrões interpretativos da CIM para *Brucella* sp. em janeiro 2006, porém não estabelece parâmetros para rifampicina (CLSI, 2006). A eficácia *in vitro* de antimicrobianos contra *Brucella* sp. tem sido verificada geralmente com base na determinação de valores de CIM por



métodos de microdiluição em caldo, diluição em ágar e E-test (Gür *et al.*, 1999; Köse *et al.*, 2005; Turkmani *et al.*, 2006). No DeMIP, em trabalho anterior, as cepas da bacterioteca foram testadas pelo método E-test frente a maioria dos antimicrobianos geralmente utilizados no tratamento e foram observadas algumas cepas com resistência plena ou intermediária para alguns antimicrobianos preconizados para o tratamento da brucelose. Entre estes antimicrobianos a rifampicina apresentou, surpreendentemente, diminuição de susceptibilidade (Magalhães Neto *et al.*, 2013- artigo submetido)

Como casos esporádicos de resistência a antimicrobianos têm sido relatados, Marianelli *et al.* (2007) sugerem uma avaliação periódica de susceptibilidade de cepas aos antimicrobianos utilizados com mais frequência no tratamento, para uma detecção precoce de qualquer resistência a drogas, especialmente nas áreas de endemicidade (López-Merino *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Gene *rpoB*:**

O alvo da RIF em procariontos é a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase DNA-dependente (RNAP) codificada pelo o gene *rpoB* e sua atividade bactericida deriva da sua alta afinidade em se ligar e inibir a RNAP bacteriana (Jin & Gross 1988, 1989; Levin & Hatfull, 1993).

O gene *rpoB* é um alvo para rifampicina, lipiarmicina, estreptolidigina e microcina J25 (Telenti *et al.*, 1993; Yang & Price, 1995; Bellomio *et al.*, 2007; Kurabachew *et al.*, 2008). Mutações distintas envolvendo regiões conservadas foram identificadas em diferentes espécies bacterianas que apresentaram

algum grau de resistência à rifampicina incluindo estudos com *Brucella* sp. (Telenti *et al.*, 1993; Herrera *et al.*, 2003; Marianelli *et al.*, 2004, 2006 e 2007).

### **2.3.3. Gene *bepC*:**

Outro gene que demonstrou estar envolvido na resistência de *Brucella* é o gene *bepC* (homólogo da proteína *tolC*) responsável pelo efluxo de vários antimicrobianos (Martin *et al.*, 2009). Posadas *et al.* (2007) investigaram o papel do gene *bepC*, o único membro da família TolC identificado no genoma de *B. suis*. Estes autores demonstraram que mutantes deficientes de *bepC* demonstraram capacidade reduzida de expulsar compostos tóxicos e relativamente hidrofóbicos, influenciando a sobrevivência de *B. suis* no interior do hospedeiro. A presença do gene *bepC* resultou numa redução considerável da susceptibilidade para compostos hidrofóbicos, tais como ampicilina, eritromicina, rifampicina, rodamina 6G e brometo de etídio, e pode contribuir também para a resistência aos compostos naturalmente presentes no hospedeiro mamífero, tais como sais biliares e esteroides (Posadas *et al.*, 2007).

### **2.4. Identificação molecular de *Brucella* sp.:**

O gênero pode ser identificado pela sequência de rRNA 16S e por PCR gênero específica para o gene *BCSP31*, e as espécies podem ser distinguidas pelo método de PCR multiplex Bruce-Ladder (Costa *et al.*, 1996; Gee *et al.*,

2004; García-Yold et al., 2006; López-Goñi et al., 2011). Até o momento, das espécies que são subdivididas em biovares, somente os biovares de *B. suis* podem ser diferenciados por método molecular; os biovares das outras espécies só podem, ainda, ser diferenciadas por uma série de testes microbiológicos tradicionais, sorologia, fagotipagem e características fenotípicas (Alton et al., 1988; López-Goñi et al. 2011).

#### 2.4.1. PCR Mutlplex Bruce- Ladder:

Garcia-Yoldi et al. (2006), desenvolveram um ensaio de PCR multiplex denominado Bruce-Ladder capaz de diferenciar a maioria das espécies de *Brucella* e as cepas vacinais no mesmo teste. Estes pesquisadores projetaram 8 pares de oligonucleotideos iniciadores, utilizando as seguintes diferenças genéticas, espécies ou cepas-específicas: (a) deleção de um fragmento de DNA de 25kb que leva à perda do gene *omp31* nas cepas de referência de todos os biovares de *B. abortus*; (b) uma deleção de 15kb compreendendo os genes *omp25b* e *wboA-wboB* em *B. ovis*; (c) uma ruptura do gene *wboA* pelo elemento *IS711* na cepa vacinal de *B. abortus* RB51; (d) uma deleção de 702pb no operon *ery* na cepa vacinal de *B. abortus* S19; (e) um mutação específica no gene *rpsL* da cepa vacinal *B. melitensis* Rev1 que a diferencia das outras cepas de referência de *B. melitensis*; (f) uma deleção de 976pb no cromossomo I específica para *B. canis*; (g) uma deleção de 2,2kb no cromossomo II específica para *B. neotomae*; (h) um fragmento de 2,6kb presente em *B. suis*, mas ausente em *B. abortus* ou *B. melitensis*, e (I) um *IS711* a jusante do elemento do gene *bp26* em *Brucella* sp. isoladas a partir de mamíferos

marinhos. Este ensaio não diferenciou as duas espécies marinhas *B. ceti* de *B. pinnipidialis* e também não se mostrou eficiente na diferenciação de *B. microti* e *B. inopinata*, descritas posteriormente.

Este ensaio foi avaliado por López-Goñi et al. (2008) em sete diferentes laboratórios europeus, sendo que algumas cepas de *B. canis* apresentaram o mesmo perfil de *B. suis*. A tipificação bacteriológica confirmou a classificação destas cepas como *B. canis*, identificando uma limitação da metodologia. Modificações deste ensaio foram feitas também por Mayer-Scholl et al. (2010) com o objetivo de diferenciar as novas espécies descritas, *B. microti* e *B. inopinata*, através da introdução de um par de oligonucleotídeo iniciador descrito para *B. microti* por Scholz et al. (2008). Este ensaio mostrou-se eficiente na identificação e distinção de *B. microti* e *B. inopinata*. Porém, o problema de diferenciação entre *B. suis* e *B. canis* ainda persistia. López-Goñi et al. (2011) desenvolveram o ensaio de PCR multiplex denominado Suis-Ladder capaz de diferenciar todos os biovars de *B. suis* e propuseram modificações no Bruce-Ladder de forma que este ensaio distinga todas as espécies de *Brucella* sp.

### 3. ARTIGO 1

#### Utilização de Bruce-Ladder modificado para identificação de *Brucella* sp.

**Autores:** Lopes, E.S.<sup>1</sup>, Machado, V.<sup>1</sup>, Simões, C.T.<sup>1</sup>, Costa, M.<sup>1</sup>

**Instituição:** <sup>1</sup> UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Rua Sarmento Leite, 500 / lab. 165. 90050-170 Porto Alegre – RS, Brasil)

#### Resumo

*Brucella* sp. são os agentes causadores da brucelose, uma doença infecciosa que afeta diversas espécies animais e pode ser transmitida para humanos por contato direto com animais infectados ou indiretamente por contaminação de produtos cárneos e lácteos, e manuseio em laboratório. Sendo uma zoonose, a detecção da brucela nos animais é essencial para a prevenção da doença em humanos. A simples identificação do gênero bacteriano não é suficiente para programas de erradicação de brucelose, que incluem regulamentos que estipulam uma resposta espécie específica, ou para se realizar um rastreamento epidemiológico, sendo que a identificação da espécie ou biovar envolvido é muito importante. Diferentes técnicas de biologia molecular têm sido propostas e testadas com o objetivo de identificar todas as espécies do gênero em um único teste rápido, seguro, reprodutível e robusto. Este estudo teve como objetivo tipificar a coleção de cepas de *Brucella* sp. da bacterioteca do laboratório de Bacteriologia Animal – UFRGS, através da aplicação do método Bruce-ladder modificado. O experimento foi realizado com 47 cepas já identificadas ao nível de espécie (28 de *B. abortus*, sete de *B. canis*, quatro de *B. melitensis*, duas de *B. ovis* e seis de *B. suis* – controles positivos) e 36 cepas identificadas como *Brucella* sp. A PCR Bruce-ladder identificou todas as cepas de *Brucella* sp. como *B. abortus*. Já nas cepas controle houve

divergência nos resultados, pois o Bruce-ladder convencional identificou 4 cepas de *B. canis* como *B. suis*. O Bruce-ladder modificado demonstrou ser um procedimento confiável capaz de diferenciar todas as espécies de *Brucella*.

## Introdução

Atualmente, existem 10 espécies reconhecidas de *Brucella*, com base nas preferências de hospedeiro, diferenças fenotípicas e patogenia: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (cães), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos, renas e lebres), *B. microti* (pequenos roedores do leste europeu), *B. pinnipidialis* (pinípedes), *B. ceti* (cetáceos) e *B. inopinata* (associada à infecção humana) reconhecida como o mais novo membro do gênero (Corbel & Banai, 2005; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008a, De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2010). Entre estas, seis são patogênicas para o homem: *B. melitensis*, *B. inopinata*, *B. suis*, *B. canis*, *B. pinnipidialis* e *B. abortus*. (Clockaert *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2003; Fugier *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008a).

Classicamente, isolados de *Brucella* são divididos em espécies por um procedimento de biotipificação que avalia uma série de propriedades relacionadas à fisiologia, fenótipo, fagotipificação e propriedades antigênicas. Algumas espécies são divididas em biovars ou biotipos por aproximadamente 25 características fenotípicas, em que *B. abortus* tem sido dividida em sete biovars, *B. melitensis* em três e *B. suis* em cinco (Alton *et al.*, 1988; Bricker, 2002; Corbel & Banai, 2005). Tais análises estão sujeitas a diferentes interpretações e devem ser executadas por técnicos qualificados devido ao risco de contaminação (García-Yoldi *et al.*, 2006).

Os genomas dos membros de *Brucella* são muito semelhantes em tamanho e posição dos genes (DeIVecchio *et al.*, 2002). Cada espécie dentro do gênero tem um tamanho médio de genoma de aproximadamente 3,29 MB e consiste de dois cromossomos circulares: cromossomo I com tamanho aproximado de 2,11 MB, e cromossomo II de 1,18 MB. O conteúdo de G+C é de 57,2% para o cromossomo I e 57,3% para o cromossomo II (Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005). As espécies de *Brucella* são intimamente relacionadas entre si (gênero monofilético), exibindo 98-99% de semelhança na maioria das sequências codificadas o que

dificulta sua diferenciação molecular, porém à medida que os estudos dos genomas completos deste gênero são estudados algumas variações têm sido observadas (Fox *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Delpino *et al.*, 2004; Halling *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2007, Whatmore, 2009).

Algumas grandes deleções e rearranjos têm sido relatados dentro de uma espécie ou biovar, porém as maiores diferenças genéticas consistem de polimorfismo de um único nucleotídeo (Bricker *et al.*, 2000; Cloeckert *et al.*, 2000; Jumas-Bilak *et al.*, 1998b; Moreno *et al.*, 2002, Foster *et al.*, 2009;). São raras as regiões de grande variabilidade entre espécies e biovars (Bricker, 2002). Estudo de Marianelli *et al.* (2007), utilizando MLVA como método de tipificação, mostram que *Brucella* sp., apesar da alta homogeneidade genética dentro do gênero, são altamente polimórficos em nível de minissatélite e microsatélites.

A pouca variação genética deve-se, provavelmente, a *Brucella* ser um gênero evolutivamente recente, assim como também não há evidências de transferência gênica transversal entre as espécies, embora algumas ilhas genômicas coerentes com transferência horizontal de outras bactérias tenham sido observadas (Paulsen *et al.*, 2002; Ratushna *et al.*, 2006). Alguns estudos indicam ocorrência esparsa de mutação e eventos raros de recombinação e sugerem uma estrutura populacional primária clonal para o gênero (Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2007. Foster *et al.*, 2008).

Garcia-Yoldi *et al.* (2006), desenvolveram um ensaio de PCR multiplex denominado Bruce-ladder capaz de diferenciar a maioria das espécies de *Brucella* e as cepas vacinais no mesmo teste. Este ensaio não diferenciou as duas espécies marinhas *B. ceti* de *B. pinnipidalis* e também não se mostrou eficiente na diferenciação de *B. microti* e *B. inopinata*, descritas posteriormente. O ensaio de PCR multiplex Bruce-ladder foi avaliado por López-Goñi *et al.* (2008) em sete diferentes laboratórios europeus, sendo que algumas cepas de *B. canis* apresentaram o mesmo perfil de *B. suis*. A tipificação bacteriológica confirmou a classificação destas cepas como *B. canis*, identificando uma limitação da metodologia.

Modificações do ensaio de PCR Bruce-ladder foram feitas por Mayer-Scholl *et al.* (2010) com o objetivo de diferenciar as novas espécies descritas, *B. microti* e *B. inopinata*, através da introdução de um par de oligonucleotídeo iniciador descrito para *B. microti* por Scholz *et al.* (2008a). Este ensaio distinguiu *B. ceti* de *B. pinnipidalis* e se mostrou eficiente na

identificação de *B. microti* e *B. inopinata*. Porém, o problema de diferenciação entre *B. suis* e *B. canis* ainda persistia.

López-Goñi et al. (2011) desenvolveram o ensaio de PCR multiplex denominado Suis-Ladder capaz de diferenciar todos os biovars de *B. suis*. Após identificar o par de oligonucleotídeos diferenciais para *B. suis* e *B. canis*, realizaram um segundo ensaio, onde modificações no Bruce-ladder foram propostas. Esta metodologia distinguiu *B. canis* de *B. suis* em todas as cepas testadas.

## **Objetivo**

Este estudo teve como objetivo tipificar a coleção de cepas de *Brucella* sp. da bacterioteca do laboratório de Bacteriologia Animal – UFRGS, através da aplicação do método Bruce-ladder modificado.

## **Materiais e métodos**

O experimento foi realizado com 47 cepas já identificadas ao nível de espécie, sendo 28 pertencentes a *B. abortus*, sete à *B. canis*, quatro à *B. melitensis*, duas à *B. ovis* e seis à *B. suis* utilizadas como controle positivo e 36 cepas identificadas apenas como *Brucella* sp.

O DNA genômico foi extraído a partir de culturas puras através de lise por calor das culturas bacterianas, conforme Scholz et al. (2008b).

Para confirmação de gênero, foram realizadas reação de PCR conforme Costa et al. (1996), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Bruc887 e Bruc1457.

Para tipificação ao nível de espécie, primeiramente foi realizado PCR multiplex Bruce-ladder convencional conforme descrito por Garcia-Yoldi et al. (2006). Em seguida foi realizado Bruce-ladder modificado a fim de testar as modificações sugeridas por López-Goñi et al. (2011).

## **Resultados e discussão**



A PCR Bruce-ladder modificada (López-Goñi *et al.*, 2011) identificou as 36 cepas de *Brucella* sp. como *B. abortus* (fragmentos de 1.682pb, 774pb, 587pb, 450pb e 152pb). Nenhuma das 36 cepas apresentou o perfil esperado para as cepas vacinais B19 e RB51 indicando que não se trata de infecção adquirida após vacinação do rebanho. O ensaio também confirmou a identificação bioquímica de todas as cepas controle de *B. abortus* (fragmentos de 1.682pb, 774pb, 587pb, 450pb e 152pb) e *B. abortus* B19 (fragmentos de 1.682pb, 774pb, 450pb e 152pb), *B. melitensis* (fragmentos de 1.682pb, 1.071pb, 774pb, 587pb, 450pb e 152pb), *B. ovis* (fragmentos de 1.071pb, 774pb, 587pb, 450pb e 152pb) e *B. suis* (fragmentos de 1.682pb, 1.071pb, 744pb, 587pb, 450pb, 272pb e 152pb). Houve divergência nos resultados para as cepas de *B. canis*, pois o Bruce-ladder convencional identificou incorretamente quatro das sete cepas de *B. canis* como *B. suis*, enquanto o Bruce-ladder modificado identificou todas as sete cepas como *B. canis* (fragmentos de 1.682pb, 1.071pb, 587pb, 450pb, 272pb e 152pb).

A única dificuldade encontrada na realização desta metodologia foi com relação ao fragmento de 1.071pb. O mesmo nem sempre apareceu nas reações de PCR multiplex, necessitando, por vezes, de um controle individual para ter certeza de sua presença. Algumas modificações foram testadas, como concentração de oligonucleotídeos iniciadores e diferentes temperaturas de anelamento, porém o problema persistiu e não foi possível visualizar o fragmento em todas as reações de PCR.

Este estudo confirma os resultados obtidos por López-Goñi *et al.* (2008) na limitação encontrada para identificação de cepas de *B. canis* pelo Bruce-ladder convencional (García-Yoldi *et al.*, 2006) e corrobora o sucesso obtido na identificação de *B. canis* através das modificações propostas por López-Goñi *et al.* (2011). Baek *et al.* (2012) também obtiveram sucesso na identificação de 16 isolados como *B. canis* através do Bruce-ladder modificado.

Os resultados demonstram a importância dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo, pois apresentam alta especificidade para espécies de *Brucella*, permitindo a correta identificação ao nível de espécie de cepas de campo, permitindo também a diferenciação entre as cepas de campo e as cepas vacinais. Este ensaio representa um grande avanço na identificação de *Brucella* sp., por se tratar de um ensaio eficaz, de menor custo, mais seguro

para os laboratoristas e ainda permite a identificação do patógeno com mais rapidez resultando em uma ação mais efetiva no combate a doença.

A brucelose é uma das mais importantes doenças reemergentes, com as espécies de *Brucella* existentes ampliando sua gama de hospedeiros, animais selvagens atuando como reservatórios e, mais recentemente espécies emergentes em mamíferos marinhos. Portanto, é importante ir além do nível de gênero a ter uma compreensão sistemática da doença (Nagalingam *et al.*, 2012). Identificação de *Brucella* sp. por testes convencionais envolve tempo, risco e requer interpretação de especialistas, enquanto que técnicas de PCR são rápidas, seguras e fácil de interpretar.

Em conclusão, o método Bruce-ladder modificado para a diferenciação das espécies de *Brucella* demonstrou ser um ensaio confiável, além de rápido e mais seguro, pois diminui a manipulação da bactéria. A brucelose continua a ser a infecção bacteriana associada a laboratório mais frequentemente relatada e manipulações em laboratório têm sido descritas como fonte de contaminação importante em humanos (Yagupsky *et al.*, 2000; Robichaud *et al.*, 2004). Ensaio de PCR rápidos e robustos são ferramentas importantes em laboratórios de rotina para diagnóstico de brucelose em animais domésticos e silvestres e podem contribuir para o controle e erradicação da doença. Este ensaio pode ser utilizado em centros de referência e em laboratórios de Microbiologia.

**Referências:**

ALTON, G.G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 190p, 1988.

BAEK, B.K. et al. The first detection of *Brucella canis* in cattle in the Republic of Korea. **Zoonoses Public Health**, Alemanha, v.59, n.2, p.77-82, 2012.

BRICKER, B.J. et al. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.38, p. 1258-1262, 2000.

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

CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O. An *IS711* element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.7, p. 835-839, 2000.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and Infection**, Inglaterra, v.3, p.729-738, 2001.

CORBEL, M.J.; BANAI, M. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, Springer, New York, pp.370-386, 2005.

COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **The Journal of Applied Bacteriology**, Inglaterra, v.81, n.3, p.267-275, 1996.

DE, B. K. et al. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos. v.46, n.1, p.43-49, 2008.

DELPINO, M.V.; FOSSATI, C.A.; BALDI, P.C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other Alpha-Proteobacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.5, p.868-873, 2004.

DELVECCHIO, V.G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.1, p.443-448, 2002.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.57, p.2688-2693. 2007.

FOSTER, J.T. et al. Real-Time PCR assay of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.46, n.1, p.296-301, 2008.

FOSTER, J.T. et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.191, n.8, p.2864-2870. 2009.

FOX, K.F. et al. Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.36, n.11, p.3217-3222, 1998.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Inglaterra, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GARCÍA-YOLDI, D. et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. **Clinical Chemistry**, Estados Unidos, v.52, n.4, p.779-781. 2006.

HALLING, S.M. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.187, n.8, p.2715-2726, 2005.

JUMAS-BILAK, E. et al. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Molecular Microbiology**, Inglaterra, v. 27, p. 99-106, 1998b.

KIM, J.A.; SHA, Z.; MAYFIELD, J.E. Regulation of *Brucella abortus* catalase. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.68, n.7, p.3861-3866, 2000.

MARIANELLI, C. et al. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.45, n.9, p.2923-2928, 2007.

LÓPEZ-GOÑI, I. et al. Evaluation of a multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.46, n.10, p. 3484-3487, 2008.

LÓPEZ-GOÑI, I. et al. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.154, n.1, p.152-155, 2011.

MAYER-SCHOLL, A. et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. **Journal of Microbiological Methods**, Holanda, v.80, n.1, p.112-114, 2010.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, p.209-227, 2002.

NAGALINGAM, M. Molecular typing of *Brucella* species isolates from livestock and human. **Tropical Animal Health and Production**, Estados Unidos, v.44, n.1, p.5-9, 2012.

PAULSEN, I.T. et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant: pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.20, p.13148-13153, 2002.

RATUSHNA, V. et al. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. **BioMed Central Microbiology**, Inglaterra, v.6, p.13-32, 2006.

ROBICHAUD, S. et al. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.38, n.12, p.119-122, 2004.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.58, p.375-382, 2008a.

SCHOLZ, H.C. et al. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v.57, p.64-71, 2008b.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Inglaterra, v.60, p.801-808, 2010.

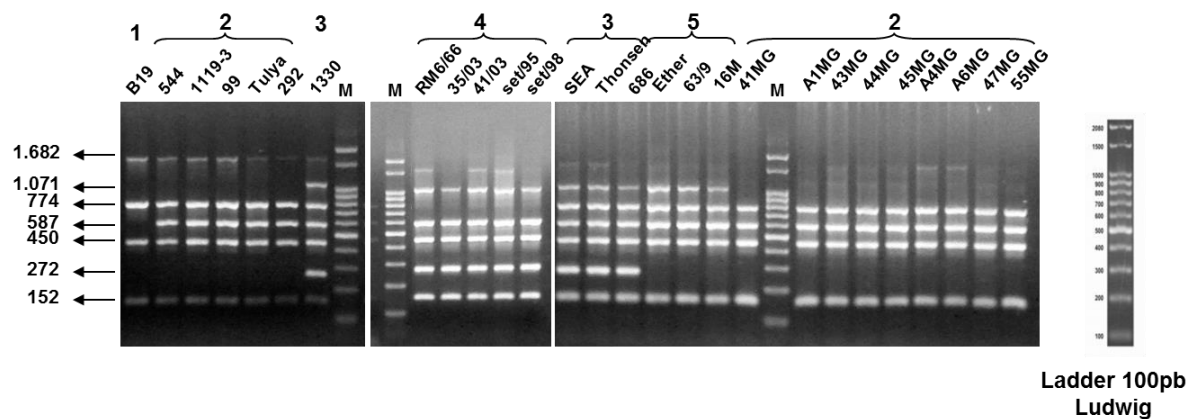
SOHN, A.H. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infectious Disease**, Estados Unidos, v.9, p.485-488, 2003.

TILLER, R.V. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.27, p.10-23, 2010.

YAGUPSKY, P. et al. Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Inglaterra, v.32, n.1, p.31-35, 2000.

WHATMORE, A.M.; PERRETT, L.L.; MAcMILLAN, A.P. Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.7, p.34-48. 2007.

WHATMORE, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, Holanda, v.9, n.6, p.1168 - 1184, 2009.



**Figura 1.** PCR multiplex Bruce-Ladder modificado: 1 = *B. abortus* vacina S19; 2 = *B. abortus*; 3 = *B. suis*; 4 *B. canis*; 5 = *B. melitensis*; M = marcador 100 pb Ludwig. Eletroforese em gel de agarose.



## 4. ARTIGO 2

### **Isolamento e identificação de *Brucella abortus* de amostras oriundas de Mato Grosso / Brasil – estudo de caso**

**Autores:** Lopes, E.S. <sup>1</sup>, Simões, C.T. <sup>1</sup>, Costa, M. <sup>1</sup>

**Instituição:** <sup>1</sup> UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Rua Sarmento Leite, 500 / lab. 165. 90050-170 Porto Alegre – RS, Brasil)

#### **Resumo**

A brucelose é uma zoonose mundial que causa significativas perdas econômicas devido a abortos e descarte dos animais infectados. No Brasil, poucos estudos discutem a identificação de espécies e biovars de *Brucella* sp., o que é necessário para o desenvolvimento de um programa eficiente de erradicação e controle da doença. Neste estudo foram isoladas cinco cepas de *B. abortus* de fetos abortados no Mato Grosso. Através de tipificação bioquímica e molecular todas as cepas foram classificadas como pertencentes aos biovars 1 ou 4, e não se referem a cepas vacinais. A fim de melhorar o conhecimento da epidemiologia da doença no país, a identificação ao nível de biovar é importante, porém só é possível em laboratórios de referência.

#### **Introdução**

A brucelose bovina é considerada um problema de saúde animal e pública, distribuída mundialmente, principalmente nos países em desenvolvimento e menor destaque nos países desenvolvidos, em que se encontra em fase avançada de controle e erradicação (Young, 1995). A doença causa impacto significativo na pecuária, pois a infecção por *Brucella* causa aborto e esterilidade em animais domésticos, sendo a maior causa de perdas econômicas diretas e uma barreira para o comércio e exportações (Pappas *et al.*, 2006; WHO, 2006; Fugier *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2009).

No Brasil a brucelose em bovídeos é causada principalmente por *B. abortus*, que resulta em perdas de produção devido a problemas de reprodução do rebanho (Corner *et al.*, 1987). As principais manifestações clínicas são o aborto, retenção de placenta e nascimento de bezerros fracos (Corbel *et al.*, 2006). *B. abortus* pode ser encontrada ocasionalmente em outros animais (cães, equinos, camelos, coiotes, roedores selvagens, cabras selvagens europeias) devido ao contato desses animais com materiais contaminados após aborto de rebanhos infectados (Almeida *et al.*, 2004, Baek *et al.*, 2003). Animais domésticos e selvagens adquirem brucelose através da ingestão de leite contaminado ou de contato com os tecidos e fluidos contaminados associados com parto ou aborto (Fugier *et al.*, 2007). Apesar das exigências complexas de crescimento “*in vitro*”, *Brucella* sp. pode resistir em determinados produtos animais e no ambiente por períodos prolongados sob circunstâncias favoráveis, podendo permanecer nas pastagens, em material de aborto ou parto por seis meses ou mais (Russel *et al.*, 1984).

*B. abortus* pode ser transmitida aos seres humanos através de animais infectados, contato direto com fetos abortados, membranas fetais ou através do consumo de leite cru e produtos derivados (Romero & Lopez-Goñi, 1999). Sendo uma zoonose, a detecção da brucelose nos animais é essencial para a prevenção da doença em humanos (Boschioli *et al.*, 2001).

A brucelose bovina devido a *B. abortus* é a mais prevalente no Brasil, seguida por *B. suis* em suínos. A brucelose em ovinos e caprinos apresenta um impacto econômico mais discreto sendo considerada de menor importância, isso devido à ausência de *B. melitensis* no país (Magalhães Neto & Gil-Turnes, 1996).

*B. abortus* apresenta 7 biovars, todos relacionados com infecção principalmente de bovídeos. Distinção entre as espécies e biovars ocorrem preferencialmente por testes diferenciais baseados em caracterização fenotípica, antígenos lipopolissacarídicos, fagotipagem, sensibilidade a corantes e antibióticos, requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S e propriedades metabólicas (Alton *et al.*, 1988, Corbel & Banai, 2005). Existem sete biovars de *B. abortus*, sendo diferenciadas umas das outras por provas bioquímicas como sensibilidade aos corantes tioina e fucsina básica, requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S e presença de antígenos de superfície (A ou M) (Alton *et al.*, 1988).

### **Objetivo**

Este trabalho teve como objetivo o isolamento, identificação e tipificação de cepas de *B. abortus* a partir de amostras de pulmão e abomaso de fetos bovinos abortados no Estado do Mato Grosso / Brasil.

### **Materiais e métodos**

#### 1) Isolamento:

Para o isolamento primário foi utilizado o meio ágar soja tripticaseína suplementado com 5-10% de soro equino. As placas contendo os inóculos a partir do material de campo foram incubadas à 35-37°C em aerobiose e microaerofilia e examinadas diariamente durante 30 dias (Alton *et al.*, 1988).

#### 2) Identificação morfológica colonial e celular:

Os isolados típicos de *Brucella* sp. foram escolhidos a partir da análise da morfologia colonial e celular. Colônias transparentes, convexas, com borda inteira e cor de mel, apresentando 0,5-1,0mm e cocobacilos Gram-negativos, curtos de 0,5-0,7 por 0,6-1,5µm,

dispostos individualmente, em pares ou pequenos grupos foram selecionados (Alton *et al.*, 1988; Moreno & Moriçon, 2006).

### 3) Tipificação:

#### 3.1.) Bioquímica:

As amostras foram submetidas aos testes bioquímicos de catalase, oxidase, urease, citrato, redução de nitrato, requerimento de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S, crescimento na presença de tionina e fucsina básica (Alton *et al.*, 1988).

#### 3.2.) Molecular:

O DNA genômico foi extraído a partir de culturas puras, através de lise por calor das culturas de células bacterianas, conforme Scholz *et al.* (2008).

Foi realizado PCR multiplex Bruce-Ladder modificado, com oito pares de oligonucleotídeos iniciadores (tabela 1). Em cada reação foram utilizados 200ng de DNA, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 400μM de cada dNTP (Amresco), 1,5U de Immolase DNA polimerase (Bioline Ltd) e seu tampão de reação, 1μM de cada oligonucleotídeo iniciador e água Milli-Q estéril para um volume final de 25μL. O DNA foi amplificado em Mastercycler Personal (Eppendorf) com desnaturação inicial a 95°C durante 7 minutos, seguido de 25 ciclos de 95°C por 35 segundos, 64°C por 45 segundos e 72°C por 3 minutos, com extensão final de 72°C por 6 minutos. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foram estimados por fluorescência em comparação com o marcador 100bp DNA Ladder (Ludwig) pelo programa Kodak 1D versão 3.5.2.

## Resultados

Foram isoladas cinco cepas de *Brucella* sp (tabela 2). Todas as cepas apresentaram os mesmos resultados nos testes bioquímicos, sendo positivo para catalase, oxidase, urease, requerimento de CO<sub>2</sub>, crescimento em aerobiose, produção de H<sub>2</sub>S e crescimento com

fucsina, e resultados negativos para citrato e crescimento com tionina. Com base nestes resultados é possível afirmar que todas as cepas pertencem à espécie *B. abortus* biovar 1 ou 4.

Na PCR multiplex Bruce-Ladder modificada, todas as cinco cepas apresentaram o perfil esperado para *B. abortus*. Nenhum dos perfis encontrado refere-se aos perfis definidos para as cepas vacinais RB51 e B19.

## **Discussão**

O diagnóstico da brucelose é uma etapa muito importante, pois a correta identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle ou vigilância epidemiológica da brucelose bovina.

Após o isolamento, a tipificação ao nível de biovar exige, além de testes fisiológicos e bioquímicos de execução simples, outros testes mais sofisticados e que não estão disponíveis em muitos laboratórios, que são a tipificação por bacteriófagos e pela sorologia com soros específicos aos seus antígenos presentes no LPS. O teste com bacteriófagos implica em um cuidado minucioso no laboratório devido ao risco de contaminação das cepas padrão e isolados com este vírus. O trabalho com soros específicos é laborioso e exige experimentos de inoculação em animais para a produção do soro e conseqüente purificação ou a importação destes reagentes. Por esta razão ainda não existe, no Brasil, um laboratório que disponha de todas as ferramentas para a tipificação de *Brucella* sp. A identificação ao nível de gênero é simples e pode ser conseguida na maioria dos laboratórios, enquanto que precisão na identificação ao nível de espécies e biovars só é possível em laboratórios de referência.

Sendo uma zoonose, a detecção da brucela nos animais é essencial para a prevenção da doença em humanos (Boschioli *et al.*, 2001). A simples identificação do gênero bacteriano é suficiente, porém, para programas de erradicação de brucelose, que incluem regulamentos que estipulam uma resposta espécie específica, ou então, para se realizar um rastreamento epidemiológico, a identificação da espécie ou biovar envolvida é muito importante (Bricker, 2002).

No Brasil existem poucos estudos realizados com relação à identificação de *B. abortus* ao nível de biovar. Garcia-Carrilo *et al.* (1972) e Megid *et al.* (2013) confirmaram a presença

dos biovars 1, 2 e 3 em bovinos no Brasil. Barbosa et al. (2009) através do estudo dos biovars de 137 amostras de diferentes estados brasileiros encontrou, pelas provas bioquímicas os biovars 1, 2, 3, 4 e 6, sendo que a biovariedade de *B. abortus* mais frequente foi a biovariedade 1 (52,5%) seguida pela biovariedade 3 (20,4%), biovariedade 6 (14,6%), biovariedade 2 (11,7%) e, a menos frequente, a biovariedade 4 (0,7%) que foi isolada de um bovino oriundo do Rio Grande do Sul, e sua origem provavelmente tenha sido dos países fronteiriços a este Estado, como a Argentina onde esta biovariedade de *B. abortus* já foi encontrada (Lucero *et al.*, 2008). Dos sete biovars de *B. abortus*, até o momento não há relato da presença do biovar 5 no Brasil.

A tipificação ao nível de biovar de amostras de *B. abortus* neste estudo pode contribuir para a compreensão da epidemiologia e controle da brucelose bovina no país.

**Referências:**

ALMEIDA, A.C. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v.56, n.2, p.275-276, 2004.

ALTON, G.G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 190p, 1988.

BAEK, B.K. et al. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v.67, n.4, p.312-314, 2003.

BARBOSA, S.M.; LOBATO, F.C.F.; COELHO, P.M.P.; LAGE, A.P. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil**. Tese de doutorado UFMG, Belo Horizonte, 77p, 2009.

BOSCHIROLI, M.L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Current Opinion in Microbiology**, Inglaterra, v.4, p.58-64, 2001.

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

CORBEL, M.J.; BANAI, M. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, Springer, NewYork, p.370–386. 2005.

CORBEL, M.J.; ELBERG, S.S.; COSIVI, O. Brucellosis in humans and animals. Geneva: **WHO Press**, 89p, 2006.

CORNER, L.A.; ALTON, G.G.; IIER, H. Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle. **Australian Veterinary Journal**, Austrália, v.64, n.8, p.241-244, 1987.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J-P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Inglaterra, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GARCIA-CARILLO, D.; SZYFRES, B.; GONZALES-TOME, J. Tipificação de brucelas isoladas del hombre y los animales en América Latina. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Mexico, v.14, p.117- 125, 1972.

GARCÍA-YOLDI, D. et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. **Clinical Chemistry**, Estados Unidos, v.52, n.4, p.779-781. 2006.

LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiology and Infection**, v.136, p.496-503, 2008.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v.16, p.75-79, 1996. MORENO, E.; MORIYÓN, I. **The genus *Brucella***, In: Prokaryotes, Ed: Springer, Nova York, p.315-456, 2006.

MEGID J. et al. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **The Veterinary Record**. Inglaterra, v.156, n.5, p.147-148, 2005.

MORENO, E.; MORIYÓN, I. **The genus *Brucella***, In: Prokaryotes, Ed: Springer, Nova York, p.315-456, 2006.



PAPPAS, G. et al. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, Estados Unidos, v.6, n.2, p.91-99, 2006.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.65, n.8, p.3735-3737, 1999.

RUSSELL, A.D.; YARNYCH, V.S.; KOULIKOVSKII, A. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Geneva : World Health Organization, 61p., 1984.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.58, p.375-382, 2008.

VIADAS, C. et al. Construction and evaluation of a ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray. **Microbial Pathogenesis**, Inglaterra, v.47, n.4, p.189-195. 2009.

ZYGMUNT et al., 2009.

YOUNG, E.H. A overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.21, n.2, p.283-289. 1995

**WORLD HEALTH ORGANIZATION**. The control of neglected zoonotic disease: a route to poverty alleviation. 2006. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301_eng.pdf)>. Acesso em: 16 de Abril de 2013.

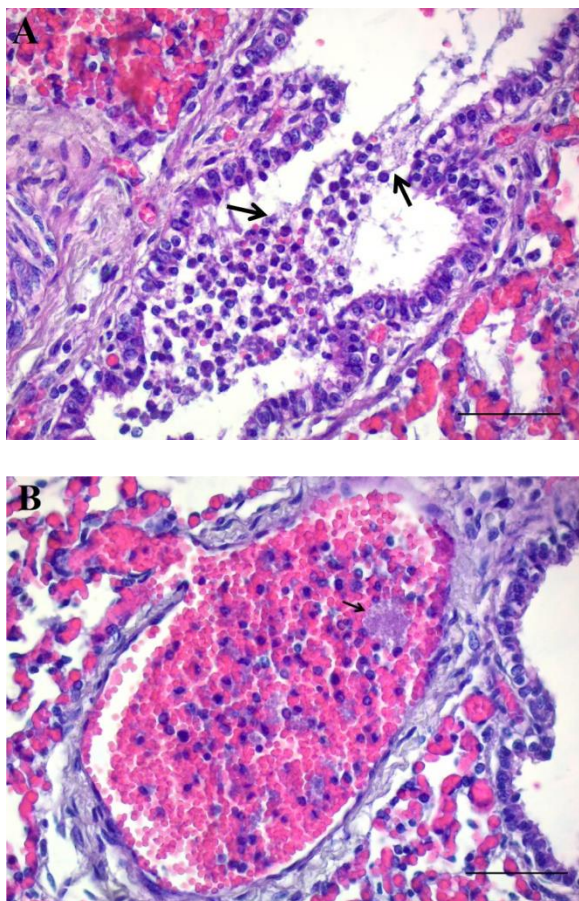


Figura 1: Pulmão de feto bovino. (A) Btoncopneumonia multifocal mononuclear moderada associada [63×] (B) com aglomerados basófilos bacterianos no interior dos bronquíolos [40×]. HO, Bar = 50  $\mu$ m.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos animais com diagnóstico de aborto por *Brucella abortus*.

<b>Amostra e identificação da propriedade</b>	<b>Localização</b>	<b>Raça dos animais</b>	<b>Sistema de criação</b>	<b>Número total de animais</b>	<b>Número de fêmeas abortadas</b>	<b>Período dos abortos (meses)</b>
1 (N461-12)	Várzea Grande-MT <sup>1</sup>	Gir	Semi-extensivo	50 <sup>3</sup>	04	7
2 (N504-12)	Guapó-GO <sup>2</sup>	Nellore	Semi-extensivo	270	16	8
3 (N520-12)	Cáceres-MT	Nellore	Semi-extensivo	7,370	16	8

1. MT= Estado do Mato Grosso do Sul; 2 GO= Estado de Goiás; 3= Lote de animais.

## 5. ARTIGO 3

### Testes de susceptibilidade antimicrobiana e caracterização molecular de resistência à rifampicina em *B. abortus* e *B. canis*

Ester Souza Lopes,<sup>a</sup> Cristina Tonial Simões,<sup>a</sup> Verônica Machado,<sup>a</sup> Marisa da Costa<sup>a#</sup>

Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia (DeMIP), Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil<sup>a</sup>

#### Resumo

A brucelose é uma doença infecciosa que afeta diversas espécies animais e pode ser transmitida para humanos, podendo causar doenças crônicas com o envolvimento de múltiplos órgãos e baixa mortalidade. O tratamento exige uma combinação de dois antimicrobianos, sendo doxiciclina e rifampicina os principais antimicrobianos recomendados pela Organização Mundial da Saúde. Casos esporádicos de resistência à rifampicina têm sido relatados. Neste estudo testamos a susceptibilidade antimicrobiana de 52 cepas de *B. abortus* e sete de *B. canis* para o antimicrobiano rifampicina, através das técnicas de microdiluição em caldo e de E-test e encontramos divergência na Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre estes testes em 21% das cepas analisadas. Realizamos a avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo testando a atividade de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (cccp) e observamos redução da CIM na presença de cccp nas oito cepas que apresentavam suscetibilidade diminuída à rifampicina. Investigando a presença de mutações que poderiam levar ao desenvolvimento do fenótipo rifampicina-resistente (Rif<sup>R</sup>) em *Brucella*, encontramos duas

mutações no gene *rpoB*. Verificamos a presença do gene *bepC* em 100% das cepas de *B. abortus* e *B. canis* testadas, porém a inibição do mecanismo de efluxo pelo *cccp* foi observado em apenas 15% das cepas de *B. abortus*, indicando a inatividade deste gene em algumas cepas.

## Introdução

A brucelose em humanos é adquirida por inalação, contato com secreções de animais contaminados, consumo de produtos lácteos não pasteurizados e produtos cárneos não maturados e mal cozidos, estabelecendo-se via cutânea, respiratória ou rota gastrointestinal. É considerada uma doença de risco ocupacional para fazendeiros, veterinários, trabalhadores de abatedouros, laboratoristas e outros que trabalham com animais ou que entram em contato com seus tecidos ou produtos não processados ou maturados. A prevalência de brucelose em humanos depende de vários fatores como hábitos alimentares, métodos de processamento de leite e derivados, práticas de manejo e higiene do ambiente (1, 2, 3, 4).

Embora a brucelose raramente seja fatal em seres humanos, pode ser severamente debilitante e incapacitante, pois se trata de uma doença febril que pode ser confundida com outras doenças, tanto infecciosas como não infecciosas, incluindo febre entérica, malária, febre reumática, tuberculose, colecistite, tromboflebite, infecção fúngica, doença auto-imune e tumores (5, 6, 7). A terapia antimicrobiana é útil para encurtar o curso natural da doença, reduzindo as complicações e prevenindo recidivas. O tratamento da brucelose exige uma combinação de dois antimicrobianos: principalmente doxiciclina e rifampicina ou doxiciclina e estreptomicina por longos períodos (8).

A rifampicina (RIF) é um potente antimicrobiano no tratamento de infecções por *Brucella* e é amplamente aceito na terapia de primeira linha; é o único antimicrobiano com atividade aumentada em condições ambientais ácidas, além de ter uma boa penetração intracelular e sinergismo evidente em terapias combinadas (9, 10, 11, 12). O alvo da RIF em procariotos é a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase DNA-dependente (RNAP) codificada pelo gene *rpoB* e sua atividade bactericida deriva da sua alta afinidade em ligar e inibir a RNAP bacteriana (13, 14, 15). Além da RIF o gene *rpoB* é um alvo para lipiarmicina, estreptolidigina e microcina J25 (16, 17, 18, 19, 20). Mutações distintas envolvendo regiões conservadas foram

identificadas em diferentes espécies bacterianas que apresentaram algum grau de resistência à RIF (17, 21, 22, 23, 24). Apesar dos isolados de *Brucella* serem geralmente considerados susceptíveis aos antimicrobianos recomendados pela OMS, casos esporádicos de resistência, incluindo a RIF, têm sido relatados, sendo desvantagem o rápido aparecimento de cepas resistentes com seu uso (25, 26, 27, 16).

Outro gene que demonstrou estar envolvido na resistência de *Brucella* é o gene *bepC* (homólogo da proteína *toIC*). Um estudo demonstrou que a presença do gene *bepC* resultou em redução da susceptibilidade para compostos hidrofóbicos, tais como ampicilina, eritromicina, rifampicina, rodamina 6G e brometo de etídio (28, 29).

Testes de susceptibilidade antimicrobiana para *Brucella* sp. não são geralmente recomendados para rotina de laboratórios de Microbiologia pela baixa frequência de resistência relatada para cada espécie, exceto em risco de vida, tais como endocardite e meningite brucélica, no caso de falha no tratamento e recidivas (30, 31). Outro problema é a falta de padronização para estes testes. O CLSI lançou os primeiros padrões interpretativos de CIM para *Brucella* sp. em janeiro 2006 (32), porém não estabelece parâmetros para RIF. A eficácia *in vitro* de antibióticos contra *Brucella* sp. tem sido testada geralmente com base na determinação de valores de CIM por métodos de microdiluição em caldo, diluição em ágar e E-test (9, 33, 34).

A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antimicrobianos e sua presença no meio ambiente (38). O uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antimicrobianos, más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência (37). A resistência aos antimicrobianos é um problema global e emergente e estudos com o objetivo de identificar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Brucella* sp, são escassos, porém conhecer os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência é de grande importância, pois possibilita o desenvolvimento de estratégias que podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência. Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são de grande importância para o entendimento dos fatores envolvidos (36). Este trabalho teve como

objetivos: (i) testar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *B. abortus* e *B. canis* da coleção do DeMIP – UFRGS (cepas de referência e campo), à RIF através das técnicas de microdiluição em caldo e de E-test com o objetivo de comparar os resultados obtidos em ambos os testes; (ii) realizar a avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo testando a atividade de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (cccpc) na possibilidade de redução de CIM à RIF em cepas de *Brucella* com fenótipo de susceptibilidade diminuída através do método de microdiluição em caldo; (iii) detectar a presença do gene *bepC*; (iv) investigar os eventos moleculares que levam ao desenvolvimento do fenótipo rifampicina-resistente (Rif<sup>R</sup>) em *Brucella* sp. através da análise do gene *rpoB*.

## **Materiais e métodos**

### **1. Testes de susceptibilidade antimicrobiana à RIF:**

- 1.1. Cepas:** foram avaliados os perfis de 52 cepas de *B. abortus*, sendo 11 de referência e 41 de campo, todas isoladas de bovinos, e sete de *B. canis* (uma de referência e seis isoladas de cães) da coleção do DeMIP - UFRGS.
- 1.2. Microdiluição em caldo:** em microplacas de cultura de 96 poços com fundo chato, foi inoculado caldo *Brucella* não suplementado contendo diferentes concentrações (32, Tabela 6A) de RIF (Sigma-Aldrich, USA) com suspensões de organismos testes equivalente à turbidez 0,5 da escala de McFarland seguido de incubação a 37°C durante 48h, seguindo as recomendações do CLSI para os potenciais agentes de bioterrorismo (32, Tabela 2K).
- 1.3. E-test:** ágar Mueller-Hinton (Oxoid, England) suplementado com 5-10% de sangue ovino citratado foi inoculado com suspensões de organismos testes equivalente à turbidez 0,5 da escala de McFarland; tiras de RIF E-test (BioMérieux, France) foram aplicadas sobre aos meios inoculados. As placas foram incubadas a 37°C e lidas após 48h. A CIM foi interpretada com o valor pelo qual a zona de inibição interceptou a escala na tira do E-test.

Os critérios interpretativos do CLSI para bactérias de crescimento lento (*Haemophilus*) foram levados em consideração para avaliar os resultados das CIMs (32, Tabela 2E). As cepas foram consideradas sensíveis quando os valores de CIM foram  $\leq 1\mu\text{g/mL}$ , resistentes quando

≥4µg/mL e intermediários quando apresentaram valores entre estes extremos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 2. Avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo:

- 2.1. **Cepas:** foram submetidas ao experimento as cepas que apresentaram susceptibilidade diminuída à rifampicina no experimento de microdiluição em caldo (n=8).
- 2.2. **Determinação de concentração não tóxica de cccp para *Brucella*:** foi realizada uma curva de concentração de cccp em microplacas de cultura de 96 poços com fundo chato, onde caldo *Brucella* (Acumedia, USA) não suplementado contendo diferentes concentrações de cccp (0 a 110µM) (Sigma-Aldrich, USA) foi inoculado com suspensões de organismos testes, equivalente à turbidez 0,5 da escala de McFarland, seguido de incubação a 37°C durante 48h. A concentração mais alta de cccp, que não inibiu o crescimento de *Brucella* foi utilizada no experimento.
- 2.3. **Microdiluição em caldo com inibidor de bomba de efluxo:** o teste foi realizado conforme o experimento de microdiluição em caldo descrito anteriormente. Em cada poço, além de RIF também foram adicionados 90µM de cccp (35).

## 3. Detecção da presença do gene *bepC*:

- 3.1. **Cepas:** Todas as 52 cepas de *B. abortus* e as sete cepas de *B. canis* foram utilizadas neste experimento.
- 3.2. **Ensaio de PCR e eletroforese:** Os primers e as condições de amplificação foram realizadas conforme descrito anteriormente (29). Buscando amplificar uma região de DNA de 1.932bp foram utilizados os primers 5' (GAA CGG GAT GAC GGG AA) e 5' (GGC GTA CCG TTT TCA ATG CA) As amplificações de PCR foram realizadas com o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil) seguindo o protocolo do fabricante no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf).



#### 4. Análise do gene *rpoB*:

- 4.1. **Cepas:** cepas que apresentaram susceptibilidade diminuída a RIF nos testes de microdiluição (n=8) e E-test (n=4) e três cepas sensíveis.
- 4.2. **Ensaio de PCR e eletroforese de dois “hotspots” dentro do gene *rpoB*:** dois testes de PCR foram realizados para amplificar duas regiões específicas no gene *rpoB*, como descritos anteriormente (22). A primeira região correspondente aos códons 118 a 240 foi amplificada pelos primers +354rB e -720rB para se obter um produto de 367bp. A segunda (denominada região central), localizado no centro do gene, correspondente aos códons 473 a 606, foi amplificado pelos oligonucleotídeos iniciadores +1418rB e -1818rB para se obter um produto de 401 bp. Os primers e as condições de amplificação foram feitos conforme Marianelli et al. (2004). As amplificações de PCR foram realizadas com o kit GoTaq DNA Polymerase (Promega, USA) segundo o protocolo do fabricante. O DNA foi amplificado em Mastercycler Personal (Eppendorf).  
  
Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foram estimados por fluorescência em comparação com o marcador 100bp DNA Ladder (Ludwig, Brasil) pelo programa Kodak 1D versão 3.5.2.
- 4.3. **Purificação dos fragmentos de DNA:** os fragmentos foram purificados utilizando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitex, Alemanha) conforme recomendações do fabricante.
- 4.4. **Sequenciamento e análise de dados:** o sequenciamento foi realizado por Macrogen Advancing Through Genomics (Coreia). As sequências geradas foram analisadas no programa Chromas Lite 2.1.1 e alinhadas entre si no programa Mega 5.05. As sequências nucleotídicas foram alinhadas e comparadas com o genoma de *B. melitensis* 16M (AE009516, substituído por AE008917) utilizado como referência em estudos anteriores no programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). O programa tBLASTx foi utilizado para tradução das

sequências de nucleotídeos em sequências de aminoácidos e alinhamento com *B. melitensis* 16M (AE009516, substituído por AE008917).

- 4.5. Números de acesso das sequências de nucleotídeos:** as sequências de nucleotídeos geradas no presente estudo foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>) e os números de adesão estão relatados na Tabela 1.

## Resultados

### 1. Testes de susceptibilidade antimicrobiana para rifampicina:

Todas as sete cepas de *B. canis* apresentaram susceptibilidade tanto no E-test quanto na microdiluição em caldo. Houve concordância de resultados com 41 das cepas de *B. abortus* testadas (79%), sendo uma cepa (13/03) com resultados de susceptibilidade intermediária e 40 cepas sensíveis ao antimicrobiano testado. Houve divergência nos resultados obtidos com 11 cepas de *B. abortus* que apresentaram perfis de susceptibilidade diferentes nos testes comparados. No E-test foram detectadas susceptibilidade reduzida em quatro cepas (8p/04, 14/02, NB135 e VM551) sendo que todas estas cepas foram susceptíveis no teste de microdiluição. Uma cepa (870) apresentou perfil RIF<sup>R</sup> no E-test e intermediário no teste de microdiluição. Enquanto que no teste de microdiluição em caldo foi detectada susceptibilidade reduzida (intermediária) em oito cepas (544, 1119-3, 870, 17a/02, 13/03, 02/06, NB94 e am.75), sendo as mesmas susceptíveis no E-test.

### 2. Avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo:

Verificamos que a menor concentração de cccp onde não foi observada atividade inibitória sobre o crescimento de *Brucella* foi de 90µM.

Todas as oito cepas de *B. abortus* (544, 1119-3, 870, 17a/02, 13/03, 02/06, NB94 e am.75) que apresentaram susceptibilidade reduzida no teste de microdiluição em caldo, quando submetidas ao experimento de avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo, apresentaram redução de CIM na presença de cccp de 2,0µg/mL para valores iguais ou inferiores a 1µg/mL de RIF.

### 3. Detecção da presença do gene *bepC*:

O fragmento contendo 1.932bp correspondente ao gene *bepC* foi observado em 100% das cepas de *B. abortus* e *B. canis* testadas.

### 4. Análise do gene *rpoB*:

Os "hotspots" do gene *rpoB* foram caracterizadas molecularmente em 15 cepas de *B. abortus*, sendo 12 (02/06, 1119-3, 13/03, NB94, VM551, NB135, 14/02, 17a/02, 544, 870, 8p/04 e am.75) com perfil de susceptibilidade reduzida a RIF e três (56, 292 e B3196) sensíveis ao antimicrobiano, após PCR e sequenciamento de DNA. Na primeira região correspondente aos códons 118 a 240 foi detectada mutação no códon 220 somente na cepa 870, em que ocorreu uma substituição de nucleotídeos de GAA para CAA resultando em uma mutação de sentido trocado (missense) alterando o aminoácido de ácido glutâmico para glutamina. No segundo fragmento, localizado no centro do gene, correspondente aos códons 473 a 606 foi encontrada uma mutação no códon 549, onde ocorreu uma substituição de nucleotídeos de ACC para ACT, resultando em uma mutação silenciosa que mantém o aminoácido treonina, em duas cepas que apresentaram susceptibilidade reduzida (17a/02 e 870) a RIF e nas três cepas susceptíveis (56, 292 e B3196) submetidas ao PCR e sequenciamento do gene *rpoB*.

## Discussão

Alguns estudos indicam que o método do E-test mostrou-se confiável, reprodutível, menos trabalhoso, mais rápido e prático quando comparado com o método de microdiluição em caldo (9, 33, 34), porém em nosso estudo encontramos divergência entre os resultados dos dois testes em 21% das cepas de *B. abortus* testadas. Nossos resultados indicam que o método padrão não deve ser substituído pelo E-test para testar a RIF em procedimentos relacionados à rotina clínica, pois há possibilidade de resultados falso positivo ou negativo, podendo acarretar em complicações e riscos ao paciente.

Um estudo anterior (29) investigou o papel do gene *bepC*, o único membro da família TolC identificado no genoma de *B. suis*, onde utilizando uma abordagem mutacional de resistência de *Brucella* à RIF, foi demonstrado que o gene *bepC* está envolvido no efluxo de vários antibióticos. Estes autores demonstraram que mutantes deficientes de *bepC*

apresentaram capacidade reduzida de expulsar compostos tóxicos e relativamente hidrofóbicos, influenciando a sobrevivência de *B. suis* no interior do hospedeiro. A presença do gene *bepC* resultou em uma redução considerável da susceptibilidade para compostos hidrofóbicos, tais como ampicilina, eritromicina, rifampicina, rodamina 6G e brometo de etídio, e pode contribuir também para a resistência aos compostos naturalmente presentes no hospedeiro mamífero, tais como sais biliares e esteroides (29). Em nosso estudo verificamos a presença do gene *bepC* em 100% das cepas de *B. abortus* e *B. canis* testadas, porém a inibição do mecanismo de efluxo foi observada em apenas oito cepas com susceptibilidade diminuída de *B. abortus*, confirmando que este mecanismo de resistência está ativo nestas cepas. Portanto apenas a presença do gene *bepC* não é fator determinante para a presença deste mecanismo, pois o gene pode estar presente, porém não estar expressando a proteína que seria por ele codificada.

A investigação de mutações que poderiam estar envolvidas na resistência intermediária a RIF encontrada em oito cepas de *B. abortus* (544, 1119-3, 870, 17a/02, 13/03, 02/06, NB94 e am.75) sugere que o fenótipo de resistência destas cepas pode não ser resultante das mutações detectadas nas regiões estudadas do gene *rpoB*, a não ser que esteja em outro ponto do gene. Não há relato na literatura sobre a mutação "missense" encontrada no códon 220 do gene *rpoB* da cepa 870 (ácido glutâmico → glutamina), porém observamos que apenas esta cepa apresentou fenótipo RIF<sup>R</sup> no E-test, sendo uma peculiaridade a ser investigada a fim de determinar a relação desta mutação com a resistência. A mutação silenciosa encontrada no códon 549 do gene *rpoB* das cepas 17a/02 e 870 com perfil de resistência intermediária a RIF, e nas três cepas susceptíveis (56, 292 e B3196) já foi descrita em estudo anterior (23) nas cepas B3196, 870 e C68 e não está relacionada com o fenótipo de resistência, uma vez que se encontra presente também em cepas sensíveis.

Nosso estudo sugere a presença de mecanismo de efluxo ativo envolvido na resistência de *B. abortus* a RIF, pois ao utilizarmos o inibidor de bomba de efluxo (ccc) como "adjuvante ou composto auxiliar" em combinação com o antimicrobiano, foi observada uma certa restauração no nível de atividade antimicrobiana resultando na redução de CIM. A inibição da atividade da bomba de bactérias Gram-negativas pode ser conseguida por diferentes maneiras. Vários compostos são capazes de recolher a energia necessária para o

transporte de drogas. Entre eles, o cccp pode afetar seriamente o nível de energia da membrana bacteriana e são usados no laboratório para suprimir totalmente o efluxo de várias drogas, constituindo uma abordagem eficaz para reverter a resistência, uma vez que induz um aumento significativo na susceptibilidade ao antimicrobiano.

O efluxo do agente antimicrobiano pode conferir um nível residual de resistência. Este mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência clínica, porém, em conjunto com outros mecanismos pode estar na origem de falhas terapêuticas (39). Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência.

Há poucos estudos sobre mecanismos de efluxo em *Brucella*, e estudos nessa área são importantes para se conhecer os diferentes mecanismos que podem estar associados ao fenótipo de resistência a diferentes antimicrobianos, bem como o desenvolvimento de estratégias que visem a inibição das bombas envolvidas, objetivando restaurar a susceptibilidade às drogas de cepas resistentes e favorecendo assim a atividade clínica de antimicrobianos que já não são mais utilizados devido ao desenvolvimento de resistência. (35).

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi apoiado pela CAPES, FAPERGS e PROAP / UFRGS.

### **Referências**

1. **Alton GG, Forsyth JRL.** 1996. *Brucella*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 28. Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8572/>>. Access: February 17, 2014.
2. **Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV.** 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 6(2):91-99.

3. **Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rösler U, Neubauer H, Tomaso H.** 2010. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? *Croat. Med. J.* **51**(4):289-295.
4. D'Anastasio R, Staniscia T, Milia ML, Manzoli L, Capasso L. 2011. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol. Infect.* **139**(1):149-156.
5. **Hasanjani Roushan MR, Mohrez M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ, Hajiahmadi M.** 2004. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. *Epidemiol. Infect.* **132**(6):1109-1114.
6. **Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E.** Brucellosis. 2005. *N. Engl. J. Med.* **352**(22):2325-2336.
7. **Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS.** 2007. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J. Med. Microbiol.* **25**(3):188-202.
8. **Young EJ, Tarry A, Genta RM, Ayden N, Gotuzzo E.** Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: report of 2 cases and literature review. 2000. *Clin. Infect. Dis.* **31**(4):904-909.
9. **Gür D, Kocagöz S, Akova M, Unal S.** 1999. Comparison of E test to microdilution for determining *in vitro* activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(9):2337.
10. **Yumuk Z, Dundar V.** 2005. The effect of long-term ethanol feeding on efficacy of doxycycline plus rifampicin in the treatment of experimental brucellosis caused by *Brucella melitensis* in rats. *J. Chemother.* **17**(5):509-513.
11. **World Health Organization.** The control of neglected zoonotic disease: a route to poverty alleviation. 2006. Available in:

[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301_eng.pdf). Access:  
November 08, 2013.

12. **Colmenero JD, Fernández-Gallardo LC, Agúndez JA, Sedeño J, Benítez J, Valverde E.** 1994. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(12):2798-2802.
13. **Jin DJ, Gross CA.** 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* **202**(1):45-58.
14. **Jin DJ, Gross CA.** 1989. Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**(9):5229-5231.
15. **Levin ME, Hatfull GF.** 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol. Microbiol.* **8**(2):277-285.
16. **Valdezate S, Navarro A, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Saéz-Nieto JA.** 2010. Molecular screening for rifampicin and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**(9):636-638.
17. **Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T.** 1993. Direct, automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(10):2054-2058.
18. **Yang X, Price CW.** 1995. Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the beta or beta' subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **270**(41):23930-23933.

19. **Bellomio A, Vincent PA, de Arcuri BF, Farías RN, Morero RD.** 2007. Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* **189**(11):4180-4186.
20. **Kurabachew M, Lu SH, Krastel P, Schmitt EK, Suresh BL, Goh A, Knox JE, Ma NL, Jiricek J, Beer D, Cynamon M, Petersen F, Dartois V, Keller T, Dick T, Sambandamurthy VK.** 2008. Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**(4):713-719.
21. **Herrera L, Jiménez S, Valverde A, García-Aranda MA, Sáez-Nieto JA.** 2003. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**(5):403-408.
22. **Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R.** 2004. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **42**(12):5439-5443.
23. **Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R.** 2006. Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. *Microbes Infect.* **8**(3):860-865.
24. **Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibilia MT, Imbriani A, Amato R, Neri D, Cuccia M, Rinnone S, Di Marco V, Ciuchini F.** 2007. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J. Clin. Microbiol.* **45**(9):2923-2928.
25. **Baykam N, Esener H, Ergönül O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B.** 2004. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int. J. Antimicrob Agents.* **23**(4):405-407.



26. **López-Merino A, Contreras-Rodríguez A, Migranas-Ortiz R, Orrantia-Gradín R, Hernández-Oliva GM, Gutiérrez-Rubio AT, Cardeñosa O.** 2004. Susceptibility of Mexican brucella isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **36(9):**636-638.
27. **Kilic S, Dizbay M, Cabadak H.** 2008. In vitro activity of tigecycline, tetracycline and fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *J. Chemother.* **20(1):**33-37.
28. **Martin FA, Posadas DM, Carrica MC, Cravero SL, O'Callaghan D, Zorreguieta A.** 2009. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* **191(8):**2530-2540.
29. **Posadas DM, Martín FA, Sabio y García JV, Spera JM, Delpino MV, Baldi P, Campos E, Cravero SL, Zorreguieta A.** 2007. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infect. Immun.* **75(1):**379–389.
30. **King A.** 2001. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. *J. Antimicrob. Chemother.* **1:**77-80.
31. **Dizbay M, Kilic S, Hizel K, Arman D.** 2007. Tigecycline: its potential for treatment of brucellosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **39(5):**432-434.
32. **Clinical And Laboratory Standards Institute.** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI, document 26:M100-S17. CLSI, Wayne, PA.
33. **Köse S, Kiliç S, Ozbel Y.** 2005. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *J. Basic Microbiol.* **45(4):**323-327.

34. **Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F, Tselentis Y.** 2006. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **5**:24.
35. **Pagès JM, Masi M, Barbe J.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol. Med.* **11**(8):382-389.
36. **Moellering RC Jr.** 1998. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clin. Infect. Dis.* **1**:S135-40.
37. **von Nussbaum F1, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D.** 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**(31):5072-129.
38. **Levy SB.** 2001. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin. Infect. Dis.* **45**(31):5072-129.
39. **Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG.** 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.* **17**(2):111-124.

Tabela 1. Números de acesso no GenBank das sequências geradas.

<b>Strains</b>	<b>1° hotspot</b>	<b>2° hotspot</b>
02/06	KJ475771	KJ475786
1119-3	KJ475772	KJ475787
13/03	KJ475773	KJ475788
NB94	KJ475774	KJ475789
VM551	KJ475775	KJ475790
NB135	KJ475776	KJ475791
14/02	KJ475777	KJ475792
17a/02	KJ475778	KJ475796
544	KJ475779	KJ475793
8p/04	KJ475780	KJ475794
am.75	KJ475781	KJ475795
56	KJ475782	KJ475798
292	KJ475783	KJ475799
B3196	KJ475784	KJ475800
870	KJ475785	KJ475797

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Apesar de casos de brucelose humana não serem de notificação compulsória, caso o foco de origem de surtos em humanos seja detectado em animais, deverá ser feita a notificação às autoridades competentes, pois no Brasil a brucelose bovina e bubalina é de notificação obrigatória, de acordo com o art. 5º do Decreto 5.741/2006, que regulamenta o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) e com a Instrução Normativa 30/2006, que disciplina a habilitação de Médicos Veterinários (Brasil, 2004).

O diagnóstico da brucelose é uma etapa muito importante, pois a correta identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle ou vigilância epidemiológica eficaz. O objetivo é reduzir a morbidade por meio de articulação com os órgãos responsáveis pelo controle sanitário dos rebanhos, alertando a vigilância sanitária sobre contaminação de produtos e a vigilância epidemiológica sobre os focos de infecção (Brasil, 2010).

A PCR Bruce-Ladder modificada apresentou alto poder discriminante para espécies de *Brucella*, permitindo a correta identificação ao nível de espécie de cepas de campo, e a diferenciação entre as cepas de campo e as cepas vacinais. Este ensaio representa um grande avanço na identificação de *Brucella* sp., por se tratar de um ensaio eficaz, mais seguro para os laboratoristas, pois diminui a manipulação da bactéria e ainda permite a identificação do patógeno com mais rapidez resultando em uma ação mais efetiva no combate a doença. Todas as cepas com espécie previamente

conhecida foram confirmadas e houve a identificação de *B. abortus* como a espécie predominante isolada em bovinos, no período analisado.

Testando a susceptibilidade de *Brucella* à rifampicina, um dos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de brucelose humana, verificamos divergência em 21% das cepas de *B. abortus* submetidas ao método do E-test e ao método de microdiluição em caldo preconizado pelo CLSI. Detectamos susceptibilidade reduzida em oito cepas de *B. abortus* (544, 1119-3, 870, 17a/02, 13/03, 02/06, NB94 e am.75) pelo método de microdiluição em caldo, e ao investigar se a presença do gene *bepC* que poderia estar relacionado a redução da susceptibilidade, verificamos sua presença em 100% das cepas de *B. abortus* e *B. canis* testadas, porém a susceptibilidade reduzida foi observada somente em 15% das cepas de *B. abortus*. Uma possibilidade é de que este gene não esteja ativo em todas as cepas, o que justificaria esta diferença.

A investigação de mutações que poderiam estar envolvidas na resistência intermediária à rifampicina encontrada em oito cepas de *B. abortus* (544, 1119-3, 870, 17a/02, 13/03, 02/06, NB94 e am.75) sugere que o fenótipo de resistência destas cepas pode não ser resultante das mutações detectadas nas regiões estudadas do gene *rpoB*, a não ser que esteja em outro ponto do gene. Não há relato na literatura sobre a mutação “missense” encontrada no códon 220 do gene *rpoB* da cepa 870 (ácido glutâmico → glutamina), porém observamos que apenas esta cepa apresentou fenótipo RIF<sup>R</sup> no E-test, sendo uma peculiaridade a ser investigada a fim de determinar a relação desta mutação com a resistência. A mutação silenciosa encontrada no códon 549 do gene *rpoB* das cepas 17a/02 e 870 com perfil de resistência intermediária a RIF, e nas três cepas susceptíveis (56, 292 e B3196) já foi descrita em estudo

anterior de Marianelli et al. (2006) nas cepas B3196, 870 (mesma cepa de referência estudada em nosso trabalho) e C68 e não está relacionada com o fenótipo de resistência, uma vez que se encontra presente também em cepas sensíveis.

Nosso estudo sugere a presença de mecanismo de efluxo ativo envolvido na resistência de *B. abortus* a rifampicina, pois ao utilizarmos o inibidor de bomba de efluxo cccp como "adjuvante ou composto auxiliar" em combinação com o antimicrobiano, foi observada restauração no nível de atividade antimicrobiana, resultando na redução de CIM. A inibição das bombas envolvidas pode restaurar a susceptibilidade às drogas de cepas resistentes e pode favorecer a atividade clínica de antimicrobianos que já não são mais utilizados devido ao desenvolvimento de resistência (Pagès & Amaral, 2009).

## 7. CONCLUSÕES

O método de PCR Bruce-Ladder modificado utilizado foi muito eficiente na diferenciação das espécies de *Brucella* sp. provenientes de diferentes regiões do Brasil e também diminuiu o tempo do diagnóstico. Através da identificação de cepas de *Brucella* sp. em *B. abortus*, podemos afirmar que a brucelose causada por *B. abortus* está presente em todo o Brasil.

O método padrão de susceptibilidade (diluição em caldo) não deve ser substituído pelo E-test para testar a rifampicina em procedimentos relacionados à rotina clínica, pois há possibilidade de resultados falso positivo ou negativo, podendo acarretar em complicações e riscos ao paciente.

A diminuição da susceptibilidade à rifampicina provavelmente está relacionado um mecanismo de efluxo. Este mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência clínica, porém, em conjunto com outros mecanismos pode estar na origem de falhas terapêuticas. Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência.

## 8. REFERÊNCIAS

ACHA, N.P.; SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, third ed., vol. 1. **Pan American Health Organization** (PAHO), Washington, DC, 2003.

AFIFI, S. et al. Hospital-based surveillance for acute febrile illness in Egypt: a focus on community-acquired bloodstream infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Estados Unidos, v.73, n.2, p.392-399, 2005.

AL-HAJJAJ, M.S. Progressive rise of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampicin and streptomycin in Riyadh, Saudi Arabia. **Respirology**, Austrália, v.6, n.4, p.317-322, 2001.

ALTON, G.G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 190p, 1988.

ALTON, G.G.; FORSYTH, J.R.L. Brucella. In: Baron, S. editor. **Medical Microbiology**. 4<sup>a</sup> edição. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Capítulo 28. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8572/> Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

ALVAREZ, R.C. et al. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. **Cellular Microbiology**, Inglaterra, v.8, n.8, p. 1322-1335, 2006.

BAYKAM, N. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, n.4, p.405-407, 2004.



BELLOMIO, A. et al. Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.189, n.41, p. 4180-4186, 2007.

BOUNAADJA, L. et al. Real time-PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of *IS711*, *bcs31* and *pr* target genes. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.137, p.156-164, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 1339/GM/1999**, Brasília. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port99/GM/GM-1339.html>>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2014.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004**. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.6-10, 12 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasaniaanimal/files/2013/03/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-06-2004-SDA1.pdf>>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias – guia de bolso**, 8.ed, Brasília, p.105-7, 2010. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guia\\_bolso.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf)>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2014.

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

CARRERA, I.A. et al. Probable transmission of brucellosis by breast milk. **Journal of Tropical Pediatrics**, Inglaterra, v.52, n.5, p.380-381, 2006.

CASSATARO, J. et al. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.1, p.111–114, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI**, documento 26:M100-S17, v.27, n.1. **CLSI**, Wayne, PA. Disponível em: <<http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>>. Acesso em: 11 de Fevereiro de 2014.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and Infection**, Inglaterra, v.3, p.729–738, 2001.

CLOECKAERT, A. et al. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification test. **Microbes and Infection**, França, v.5, n.7, p.593-602. 2003.

COLMENERO, J.D. et al. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos, v.38, n.12, p.2798-2802, 1994.

COOK, W.E. et al. *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. I. Efficacy of reduced dosage. **Journal of Wildlife Diseases**, Estados Unidos, v.38, n.1, p.18-26, 2002.

CORBEL, M.J.; BANAI, M. Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, Springer, New York, pp.370-386, 2005.

COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **The Journal of Applied Bacteriology**, Inglaterra, v.81, n.3, p.267-275, 1996.

DAHOUK, S.A. et al. Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962-2005. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.13, n.12, p.1895-900, 2007.

D'ANASTASIO, R. et al. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. **Epidemiology and Infection**, Inglaterra, v.139, n.1, p.149-56, 2011.

DE, B. K. et al. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos. v.46, n.1, p.43-49, 2008.

DELPINO, M.V.; FOSSATI, C.A.; BALDI, P.C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other Alpha-Proteobacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.5, p.868-873, 2004.

DIZBAY, M. et al. Tigecycline: its potential for treatment of brucellosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Inglaterra, v.39, n.5, p.432-434, 2007.

DRAGOSAVAC, D. et al. Endocardite por Brucelose. Relato de Caso. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Brasil, v.19, n.3, p.354-356, 2007.

FERREIRA, C.R. et al. Espondilodiscite brucelósica: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.35, p.255-258, 2002.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.57, p.2688-2693. 2007.

FRANCO, M.P. et al. Human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, Estados Unidos, v.7, n.12, p.775-786. 2007.

FRETIN, D. et al. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. **Cellular Microbiology**, Inglaterra, v.7, n.5, p. 687-698, 2005.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Inglaterra, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GÁNDARA, B. et al. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.39, n.1, p.235-240, 2001.

GARCÍA-YOLDI, D. et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. **Clinical Chemistry**, Estados Unidos, v.52, n.4, p.779-781. 2006.

GWIDA, M. et al. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? **Croatian Medical Journal**, Croácia, v.51, n.4, p.289-295, 2010.

GEE, J.E. et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.42, p.3649-3654, 2004.

GOTUZZO, E. et al. Brucellar arthritis: a study of 39 Peruvian families. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Inglaterra, v.46, n.7, p.506-509, 1987.

GÜR, D. et al. Comparison of E test to microdilution for determining *in vitro* activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos, v.43, n.9, p.2337, 1999.

HERRERA, L. et al. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Holanda, v.21, n.5, p.403-408, 2003.

JIN, D.J.; GROSS, C.A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. **Journal of Molecular Biology**, Inglaterra, v.202, n.1, p.45-58, 1988.

JIN, D.J.; GROSS, C.A. Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.171, n.9, p.5229-5231, 1989.

JUMAS-BILAK, E. et al. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.180, n.10, p.2749-2755, 1998.

KATO, Y. et al. Brucellosis in a returned traveler and his wife: probable person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. **Journal of Travel Medicine**, Estados Unidos, v.14, n.5, p.343-345, 2007.

KHAN, M.Y.; MAH, M.W.; MEMISH, Z.A. Brucellosis in pregnant women. **Clinical Infectious Disease**, Estados Unidos, v.32, n.8, p.1172-1177. 2001.

KILIC, S.; DIZBAY, M.; CABADAK, H. In vitro activity of tigecycline, tetracycline and fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. **Journal of Chemotherapy**, Itália, v.20, n.1, p.33-37, 2008.

KING, A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.48, n.1, p.77-80, 2001.

KÖHLER. S. et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Estados Unidos, v.99, n.24, p.15711-15716, 2002.

KÖSE, S.; KILIÇ, S.; OZBEL, Y. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. **Journal of Basic Microbiology**, Alemanha, v.45, n.4, p.323-327, 2005.

KURABACHEW, M. et al. Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.62, n.4, p.713-719, 2008.

LAWINSKY, M.L.J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.4, p.75-84, 2010.

LECARÓZ, C. et al. Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.58, n.3, p.549–556, 2006.

LEVIN, M.E.; HATFULL, G.F. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. **Molecular Microbiology**, Inglaterra, v.8, n.2, p.277-285, 1993.

LINDBERG, J. LARSSON, P. Transmission of *Brucella melitensis*. **Lancet**, Inglaterra, v.337, n.8745, p.848-849, 1991.

LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. *Brucella*: molecular and cellular biology. Universidade de Navarra, Pamplona. **Horizon Scientific Press**: Inglaterra, 432p. 2004.

LÓPEZ-GOÑI, I. et al. Evaluation of multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing all *Brucella* species, including the vaccine strains. **Journal of clinical microbiology**, Estados Unidos, v.46, n.10, p.3484-3487, 2008.

LÓPEZ-GOÑI, I. et al. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.154, n.1, p.152-155, 2011.

LÓPEZ-MERINO, A. et al. Susceptibility of Mexican *Brucella* isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Inglaterra, v.36, n.9, p.636-638, 2004.

MAGALHÃES NETO, A. et al. Antimicrobial susceptibility profile of *Brucella* sp. isolated in Brazil. **Artigo submetido à Revista de Patologia Tropical**, Brasil, 2013.

MANTUR B.G.; AMARNATH, S.K.; SHINDE, R.S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, India, v.25, n.3, p.188-202, 2007.

MANTUR, B.G. et al. Bacteremia is as unpredictable as clinical manifestations in human brucellosis. **International Journal of Infectious Diseases**, Canadá, v.12, p.303-307, 2008.

MARIANELLI, C. et al. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.42, n.12, p.5439-5443, 2004.

MARIANELLI, C. et al. Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. **Microbes and Infection**, França, v.8, n.3, p.860-865, 2006.

MARIANELLI, C. et al. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v.45, n.9, p.2923-2928, 2007.

MARTIN, F.A. et al. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.191, n.8, p.2530-2540, 2009.

MASJEDI, M.R. et al. Extensively drug-resistant tuberculosis: 2 years of surveillance in Iran. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.43, n.7, p.841-847, 2006.

MAYER-SCHOLL, A. et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. **Journal of Microbiological Methods**, Holanda, v.80, n.1, p.112-114, 2010.

MEDIAVILLA, P.S. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.10, n.4, p.647-651, 2003.

MELLO, C.C.F. et al. Espondilodiscite por brucelose: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, n.40, p.469-472, 2007.

MELTZER, E. et al. Sexually transmitted brucellosis in humans. **Clinical infectious diseases**, Estados Unidos, v.51, n.2, p.12-15, 2010.

NAVARRO, E.; CASAO, M.A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Inglaterra, v.4, p.115-123. 2004.

NIMRI, L.F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BioMedCentral Infectious Diseases**, Inglaterra, v.3, p.5-11, 2003.

PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v.1794, n.5, p.826-833, 2009.

PAPPAS. G. et al. Brucellosis. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v.352, n.22, p.2325-36, 2005.



PAPPAS. G. et al. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Disease**, Estados Unidos, v.6, n.2, p.91-99, 2006a.

PAPPAS. G. et al. *Brucella* as a biological weapon. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Suíça, v. 63, n.19, p.2229-2236, 2006b.

POSADAS, D. M. et al. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.75, n.1, p.379-89, 2007.

RAMOS, T.R.R. et al. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, Brasil, n.12, v.2, p.133-138, 2008.

REGUERA, J.M. et al. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Alemanha, v.22, n.11, p.647-650, 2003.

ROBICHAUD, S. et al. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.38, n.12, p.119-122, 2004.

ROUSHAN. M.R.H. et al. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. **Epidemiology and Infection**, Inglaterra, v.132, n.6, p.1109-1114, 2004.

RUBEN, B. et al. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. **Lancet**, Inglaterra, v.337, n.8732, p.14-15, 1991.

SANTANA-PORTO, E.A. et al. Investigação de casos de brucelose humana em Araguaína no Estado do Tocantins, Brasil, junho de 2008. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasil, ano.08, n.12, 2008.

SANTOS NETO, L.L. et al. Abscesso esplênico por *Brucella abortus*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasil, n.32, p.53-55, 1999.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.58, p.375-382, 2008.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Inglaterra, v.60, p.801-808, 2010.

SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.140, n.3, p.392-398, 2010.

SINGH, K. Laboratory-acquired infections. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.49, n.1, p.142-147, 2009.

SKENDROS, P. et al. CD80/CD28 co-stimulation in human brucellosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Inglaterra, v.146, n.3, p.400-408, 2006.

SMITS, H.L. et al. Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.10, n.6, p.1141-1146, 2003.

SOHN, A.H. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infectious Disease**, Estados Unidos, v.9, p.485-488, 2003.

SOLERA, J.; MARTÍNEZ-ALFARO, E.; ESPINOSA, E. Recognition and optimum treatment of brucellosis. **Drugs**, Nova Zelândia, v.53, n.2, p.245-256, 1997.

SOLERA, J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Holanda, v.36, n.1, p.S18-S20, 2010.

TALESKI, V. et al. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. **Veterinary Microbiology**, Holanda, v.90, n.1, p.147-155, 2002.

TELENTI, A. et al. Direct, automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Estados Unidos, v.37, n.10, p. 2054-2058, 1993.

THALHAMMER, F.; EBERL, G.; KOPETZKI-KOGLER, U. Unusual route of transmission for *Brucella abortus*. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.26, n.3, p.763-764, 1998.

TILLER, R.V. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BioMedCentral Microbiology**, Inglaterra, v.27, p.10-23, 2010.

TURKMANI, A. et al. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Inglaterra, v.2, n.5, p.24, 2006.

VALDEZATE, S. et al. Molecular screening for rifampicin and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Inglaterra, v.36, n.9, p.636-638, 2010.

VELASCO, J. et al. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v.68, n.6, p.3210-3218, 2000.

VIZCAÍNO, N. et al. DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. **Microbes and Infection**, França, v.6, n.9, p.821-834, 2004.

YAGUPSKY, P. et al. Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Inglaterra, v.32, n.1, p.31-35, 2000.

YANG, X.; PRICE, C.W. Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the beta or beta' subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. **The Journal of Biological Chemistry** , Estados Unidos, v.270, n.41, p.23930-23933, 1995.

YOUNG, E.J. A overview of human brucellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.21, n.2, p.283-289. 1995

YUMUK, Z.; DUNDAR. V. The effect of long-term ethanol feeding on efficacy of doxycycline plus rifampicin in the treatment of experimental brucellosis caused by *Brucella melitensis* in rats. **Journal of Chemotherapy**, Itália, v.17, n.5, p.509-513, 2005.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** The control of neglected zoonotic disease: a route to poverty alleviation. 2006. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241594301_eng.pdf)>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2014.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** [home page on the internet]. Brucellosis (human). Excerpt from "WHO recommended standards and strategies for surveillance, prevention and control of communicable diseases" Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/Brucellosissurveillance.pdf?ua=1>>. Acesso em 29 de janeiro de 2014.

## 9. APÊNDICES:

**Tabela 1.** Dados das cepas de *B. abortus* isoladas e identificadas a partir de fetos abortados em propriedades da região centro-oeste do Brasil.

<b>Cepa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fonte</b>
03/12	N461/12	pulmão
04/12	N461/12	abomaso
05/12	N520/12	pulmão
07/12	N504/12	pulmão
08/12	N504/12	abomaso

**Tabela 2.** Cepas de *B. abortus* e *B. canis* testadas e seus perfis de susceptibilidade a rifampicina por E-test e microdiluição em caldo.

Espécie / biovar	Cepa	Origem	E-test <sup>1</sup>	Microdiluição <sup>1</sup>
<i>B. abortus</i> 1	544	referência - IPVDF <sup>2</sup>	S	I
<i>B. abortus</i> 1	1119-3	referência - IPVDF	S	I
<i>B. abortus</i> 6	870	referência - AFSSA <sup>3</sup>	R	I
<i>B. abortus</i> 3	17a/02	campo - RS	S	I
<i>B. abortus</i> 1	13/03	campo - Minas do Leão / RS	I	I
<i>B. abortus</i> 1	02/06	campo - Estância Velha / RS	S	I
<i>B. abortus</i>	am.75	campo - Estância Velha / RS	S	I
<i>B. abortus</i>	NB94	campo - Nova Bassano / RS	S	I
<i>B. abortus</i> R <sup>4</sup>	8p/04	campo - São Lourenço do Sul / RS	I	S
<i>B. abortus</i> 1	14/02	campo - Arroio Grande / RS	I	S
<i>B. abortus</i>	NB135	campo - Nova Bassano / RS	I	S
<i>B. abortus</i>	VM551	campo - Vila Maria / RS	I	S
<i>B. abortus</i> 1	B19	referência - IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 1	B875	IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 2	86/08/59	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 3	Tulya	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 4	292	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 5	B3196	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 7	99	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 9	C68	referência - AFSSA	S	S
<i>B. abortus</i> 1	56	campo - Rio Pardo / RS - IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 1	96	campo - Rio Pardo / RS - IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 1	577	campo - Caçapava do Sul / RS - IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 1	477	campo - Itaqui / RS - IPVDF	S	S
<i>B. abortus</i> 1	13a/02	campo - Butiá / RS	S	S
<i>B. abortus</i> 1	13b/02	campo - Butiá / RS	S	S
<i>B. abortus</i> 1	14/03	campo - Minas do Leão / RS	S	S
<i>B. abortus</i> 1	15/03	campo - Minas do Leão / RS	S	S
<i>B. abortus</i> 1	13/02	campo - Butiá / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	55MG	campo - Minas Gerais	S	S
<i>B. abortus</i>	am.70	campo - Estância Velha / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	Ba02	campo - Nova Bassano / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	Ba06	campo - Nova Bassano / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	Ba22	campo - Nova Bassano / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	47MG	campo - Minas Gerais	S	S
<i>B. abortus</i>	11/03/2006		S	S
<i>B. abortus</i>	RP set./07	campo - Rio Pardo / RS	S	S

<i>B. abortus</i>	VM07	campo - Vila Maria / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	CB março/?	campo - Campo Bom / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	VM82	campo - Vila Maria / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	VM10	campo - Vila Maria / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	RP ab./08	campo - Rio Pardo / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	NB57	campo - Nova Bassano / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	VM88	campo - Vila Maria / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	T ab./08	campo - Taquara / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	mar/07	campo - Jaguarão / RS	S	S
<i>B. abortus</i>	41MG	campo - Minas Gerais	S	S
<i>B. abortus</i>	03/12	campo - Mato Grosso	S	S
<i>B. abortus</i>	04/12	campo - Mato Grosso	S	S
<i>B. abortus</i>	05/12	campo - Mato Grosso	S	S
<i>B. abortus</i>	07/12	campo - Mato Grosso	S	S
<i>B. abortus</i>	08/12	campo - Mato Grosso	S	S
<i>B. canis</i>	RM6/66	referência - AFSSA	S	S
<i>B. canis</i>	set/95	campo - Uruguaiana / RS	S	S
<i>B. canis</i>	set/98	campo - Paraná	S	S
<i>B. canis</i>	35/03	campo - São Paulo	S	S
<i>B. canis</i>	41/03	campo - São Paulo	S	S
<i>B. canis</i>	28/09/2004	Campo	S	S
<i>B. canis</i>	21/10/1998	Campo	S	S

<sup>1</sup>: S = sensível; I = intermediário; R = resistente; <sup>2</sup>: IPVDF, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; <sup>3</sup>: EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, French Food Safety Agency (AFSSA), <sup>4</sup> R: fenótipo rugoso.

**Tabela 3.** Resultados do teste de avaliação do fenótipo de super expressão de bomba de efluxo em cepas de *B. abortus* com perfil de susceptibilidade reduzida no teste de susceptibilidade antimicrobiana para rifampicina em microdiluição em caldo.

Cepa	CIM <sup>1</sup> na presença de RIF <sup>2</sup> (µg/mL)	CIM na presença de RIF + cccp <sup>3</sup> (µg/mL)
544	2,0	0,625
1119-3	2,0	0,25
870	2,0	0,25
17a/02	2,0	0,03
13/03	2,0	0,625
02/06	2,0	1,0
NB94	2,0	0,625
am.75	2,0	0,25

<sup>1</sup> Concentração inibitória mínima; <sup>2</sup> rifampicina; <sup>3</sup> carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.



**Tabela 4.** Cepas utilizadas no experimento Bruce-Ladder modificado.

<b>Espécie e biovar</b>	<b>Cepa</b>	<b>Origem</b>
<i>B. melitensis</i>		
<i>B. melitensis</i> 1	REV1	Referência - AFSSA
<i>B. melitensis</i> 1	16M	Referência - IPVDF
<i>B. melitensis</i> 2	63/9	Referência - AFSSA
<i>B. melitensis</i> 3	Ether	Referência - AFSSA
<i>B. ovis</i>		
<i>B. ovis</i>	REO198	Referência - IPVDF
<i>B. ovis</i>	63/690	Referência - AFSSA
<i>B. suis</i>		
<i>B. suis</i> 1	1330	Referência - IPVDF
<i>B. suis</i> 1	SEA	Referência - IPVDF
<i>B. suis</i> 2	Thonsen	Referência - AFSSA
<i>B. suis</i> 3	686	Referência - AFSSA
<i>B. suis</i> 4	40	Referência - AFSSA
<i>B. suis</i> 5	5513	Referência - AFSSA
<i>B. canis</i>		
<i>B. canis</i>	RM6/66	Referência - AFSSA
<i>B. canis</i>	set/95	Campo - Uruguaiana / RS
<i>B. canis</i>	set/98	Campo - Paraná
<i>B. canis</i>	35/03	Campo - São Paulo
<i>B. canis</i>	41/03	Campo - São Paulo
<i>B. canis</i>	28/09/2004	Campo
<i>B. canis</i>	21/10/1998	Campo
<i>B. abortus</i>		
<i>B. abortus</i> 1	544	Referência - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	1119-3	Referência - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	B19	Referência - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	B875	IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	99	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 2	86/08/59	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 3	Tulya	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 4	292	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 5	B3196	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 6	870	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 9	C68	Referência - AFSSA
<i>B. abortus</i> 3	17a/02	Campo - RS
<i>B. abortus</i> 1	13/03	Campo - Minas do Leão / RS
<i>B. abortus</i> 1	14/03	Campo - Minas do Leão / RS

<i>B. abortus</i> 1	15/03	Campo - Minas do Leão / RS
<i>B. abortus</i> 1	02/06	Campo - Estância Velha / RS
<i>B. abortus</i> 1	14/02	Campo - Arroio Grande / RS
<i>B. abortus</i> 1	56	Campo - Rio Pardo / RS - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	96	Campo - Rio Pardo / RS - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	577	Campo - Caçapava do Sul / RS - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	477	Campo - Itaqui / RS - IPVDF
<i>B. abortus</i> 1	13a/02	Campo - Butiá / RS
<i>B. abortus</i> 1	13b/02	Campo - Butiá / RS
<i>B. abortus</i> 2	33MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i> 2	34MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i> rugosa	8p/04	Campo - São Lourenço do Sul / RS
<i>B. abortus</i>	8g/04	Campo - São Lourenço do Sul / RS
<i>Brucella</i> sp. identificadas como <i>B. abortus</i>		
<i>B. abortus</i>	41MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	A1MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	43MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	44MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	45MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	A4MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	A6MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	47MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	55MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	13/02	Campo - Butiá/ RS
<i>B. abortus</i>	am.70	Campo - Estância Velha / RS
<i>B. abortus</i>	am.75	Campo - Estância Velha / RS
<i>B. abortus</i>	NB94	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	NB135	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	VM551	Campo - Vila Maria / RS
<i>B. abortus</i>	Ba02	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	Ba06	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	Ba22	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	11/03/2006	
<i>B. abortus</i>	set./07	Campo - Rio Pardo / RS
<i>B. abortus</i>	VM07	Campo - Vila Maria / RS
<i>B. abortus</i>	CB março/?	Campo - Campo Bom / RS
<i>B. abortus</i>	VM82	Campo - Vila Maria / RS
<i>B. abortus</i>	VM10	Campo - Vila Maria / RS
<i>B. abortus</i>	RP ab./08	Campo - Rio Pardo / RS
<i>B. abortus</i>	NB57	Campo - Nova Bassano / RS
<i>B. abortus</i>	VM88	Campo - Vila Maria / RS
<i>B. abortus</i>	ab./08	Campo - Taquara / RS

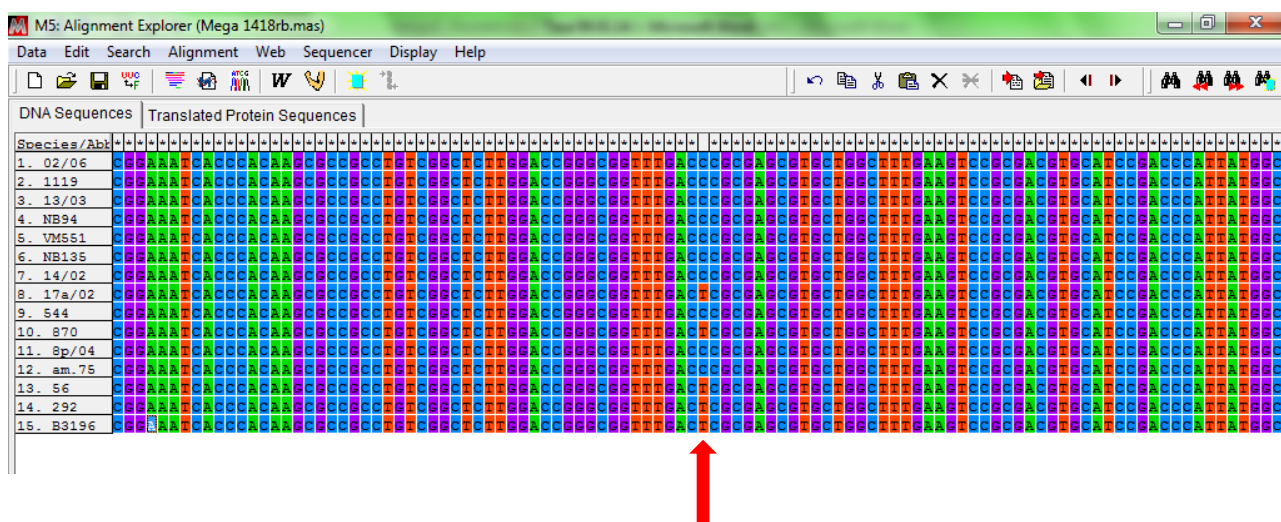
<i>B. abortus</i>	mar/07	Campo - Jaguarão / RS
<i>B. abortus</i>	41MG	Campo - Minas Gerais
<i>B. abortus</i>	17b/02	Campo – RS
<i>B. abortus</i>	03/12	Campo - Mato Grosso
<i>B. abortus</i>	04/12	Campo - Mato Grosso
<i>B. abortus</i>	05/12	Campo - Mato Grosso
<i>B. abortus</i>	07/12	Campo - Mato Grosso
<i>B. abortus</i>	08/12	Campo - Mato Grosso

---

a)



b)



**Figura 1.** Imagem da tela do programa Mega 5.05 utilizado para identificação de mutações nas sequências de DNA das regiões hipervariáveis do gene *rpoB*: a) região correspondente aos códons 118 a 240; mutação na cepa 870; b) região correspondente aos códons 473 a 606; mutação nas cepas com susceptibilidade reduzida (17a/02 e 870) e nas três cepas sensíveis (56, 292 e B3196) a rifampicina.