

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA  
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE  
*BRUCELLA CANIS***

**Autora: Camila Azevedo Moni**

**PORTO ALEGRE**

**2023/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA  
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE  
*BRUCELLA CANIS***

**Autora: Camila Azevedo Moni**

**Trabalho apresentado à  
Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para a obtenção  
da graduação em Medicina  
Veterinária**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra.  
Franciele Maboni Siqueira**

**PORTO ALEGRE**

**2023/1**

### CIP - Catalogação na Publicação

Azevedo Moni, Camila  
Caracterização genômica e fenotípica de isolados de  
Brucella canis / Camila Azevedo Moni. -- 2023.  
39 f.  
Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. 2.  
Sequenciamento genômico. 3. Montagem híbrida. 4. MLST.  
5. SNPs. I. Maboni Siqueira, Franciele, orient. II.  
Título.

Camila Azevedo Moni

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE  
BRUCELLA CANIS

Aprovado em 8 SET 2023

APROVADO POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciele Maboni Siqueira  
Orientadora e membro da banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa da Costa  
Membro da banca examinadora

---

Bsc. Maria Eduarda Rocha Jacques da Silva  
Membro da banca examinadora

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à minha família por sempre me apoiarem nos meus sonhos e estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sem vocês eu não chegaria aonde estou. Agradeço também ao meu marido, que tem sido um grande apoio nessa reta final do curso e que sempre me incentiva nos meus projetos. Minhas duas gatas, Yuumi e Nami, por tirarem as melhores sonecas ao meu lado enquanto desenvolvia os meus afazeres acadêmicos. Aos meus amigos, por, mesmo sem entender a maioria dos assuntos da minha área, mesmo assim se empenharam em me ouvir e tentar ajudar, além de serem muito solícitos quando precisava de uma distração do mundo acadêmico.

Não poderia deixar de agradecer à espiritualidade que age de forma misteriosa, fazendo com que nem sempre saibamos os seus motivos, levando muitas vezes a questioná-la; porém, lá para frente, nos mostra que o desenrolar dos acontecimentos não poderiam ter ocorrido de forma melhor.

Agradeço a equipe do LaBacVet, que serviu como uma segunda casa para mim nesses últimos anos, me proporcionando conhecimento e permitindo o meu amadurecimento. À minha duplinha de graduação e estágio, que trouxe leveza durante esses anos de faculdade e de pesquisa. À minha orientadora, que sempre se fez muito presente e preocupada em transmitir o conhecimento, além de cativar com o seu amor a profissão e empenho em mostrar que a biologia é linda.

## RESUMO

A *Brucella canis*, causadora da brucelose, é um patógeno listado pelo Organização Mundial da Saúde Animal (WOAH) como uma das zoonoses emergentes negligenciadas na atualidade. É responsável por perdas econômicas, assim como problemas de saúde pública. Estima-se que haja meio milhão de casos de brucelose ao ano no mundo, sendo destes, 1% causados pela *B. canis*. Apesar disso, ainda há poucos estudos acerca do perfil genômico e quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para esta bactéria. Por isso, esse trabalho tem como objetivo realizar a caracterização genômica e fenotípica de 19 isolados de *B. canis* isolados de caninos do sul do Brasil entre os anos de 1995 a 2015. Para isso, realizou-se análises *in silico* e *in vitro*. Para a caracterização genômica e filogenética, realizou-se a montagem híbrida das *reads* brutas geradas através de dois sequenciadores de última geração distintos. Para os testes de susceptibilidade *in vitro*, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos isolados frente a quatro antimicrobianos. Através das análises genômicas, detectou-se a presença de dois genes de resistência a antimicrobianos em todos os isolados, denominados *DNA gyrase subunit A* (*gyrA*) e *Alanil phosphatidylglycerol synthase* (A-PGS). Além disso, as análises filogenéticas demonstraram o predomínio do *sequence type* 20 (ST20) entre as cepas desse estudo, assim como a delimitação de duas linhagens de *B. canis* distintas baseada em SNPs. Quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, os isolados do presente estudo demonstraram um perfil semelhante entre eles, onde a gentamicina foi a droga mais eficaz nos ensaios *in vitro*. Por fim, os resultados obtidos através desse trabalho contribuem com informações acerca do perfil genômico e filogenético de isolados de *B. canis* do sul do Brasil, possibilitando novas perspectivas de tratamento e prevenção para a brucelose canina.

**Palavras-chave:** perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, sequenciamento genômico, montagem híbrida, MLST, SNPs

## **ABSTRACT**

*Brucella canis*, which causes brucellosis, is a pathogen listed by the World Organization for Animal Health (WOAH) as one of the currently neglected emerging zoonoses. It is responsible for economic losses as well as public health problems. It is estimated that there are half a million cases worldwide per year, of which 1% are caused by *B. canis*. Despite this, there are still few studies about the genomic profile and the antimicrobial susceptibility profile. Therefore, this work aims to explore the genomic and phenotypic characterization of 19 *B. canis* isolates from dogs in south Brazil during the years of 1995 to 2015. For this, *in silico* and *in vitro* analyzes were performed. For the genomic and phylogenetic characterization, hybrid assembly of the raw reads generated through two different sequencers was performed. For the *in vitro* susceptibility tests, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the isolates against four antimicrobials were determined. The presence of two antimicrobial resistance genes was detected in all isolates, DNA gyrase subunit A (*gyrA*) and Alanine phosphatidylglycerol synthase (APGS). In addition, phylogenetic analyzes demonstrated the predominance of sequence type 20 (ST20) among the strains in this study, as well as the delimitation of two distinct world lineages based on single nucleotide polymorphism (SNP). As for the antimicrobial susceptibility profile, the isolates in the present study showed a similar profile among them, with gentamicin being the most effective drug. Finally, the results obtained through this work contribute with information about the genomic and phylogenetic profile of *B. canis* isolates from south Brazil, providing new perspectives for treatment and prevention for canine brucellosis.

**Key-words:** antimicrobial susceptibility profile, Whole-genome sequencing, hybrid assembly, MLST, SNPs

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Coloração de Ziehl-Neelsen modificado de *Brucella canis* ..... 9
- Figura 2** - Mapa circular exibindo cromossomos I e II de *Brucella canis* cepa Oliveri 13
- Figura 3** - Árvore filogenética por SNPs de 53 cepas de *Brucella canis* ..... 15

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Gênero <i>Brucella</i> .....	9
2.2 <i>Brucella canis</i> .....	10
2.3 Antibioticoterapia para brucelose canina .....	11
2.4 Características dos genomas do gênero <i>Brucella</i> .....	12
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos .....	16
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>17</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Brucella canis*, causadora da brucelose canina, é um patógeno de caráter zoonótico e de incidência mundial, sendo listada pela Organização Mundial da Saúde (WOAH) como uma das zoonoses negligenciadas na atualidade. A soroprevalência em cães pode chegar a 35% em regiões como África, Ásia e América do Sul (HENSEL *et al.*, 2018), sendo considerada uma doença endêmica no Brasil (GIRAULT *et al.*, 2018; VICENTE *et al.*, 2018). Estima-se que ocorra cerca de meio milhão de novos casos de brucelose humana por ano, com uma distribuição geográfica mundial bem variada, com cerca de 1% desses casos sendo causados pela *B. canis* (SANTOS *et al.*, 2021); todavia, acredita-se que os números apresentados sejam inferiores à realidade, devido ao fato de muitos casos serem subdiagnosticados já que os sintomas da brucelose são considerados inespecíficos (SANTOS *et al.*, 2021).

A transmissão da bactéria ocorre via aerossóis, oral e sexual (MCVEY *et al.*, 2016). Pode ocorrer a transmissão da doença de animais para humanos, assim como a transmissão entre humanos também pode ocorrer (OSMAN *et al.*, 2016). Animais de rua e de canis, tanto comerciais como de abrigos, costumam ter uma maior exposição a *B. canis* (DE MASSIS *et al.*, 2022; SEBZDA; KAUFFMAN, 2023). Os animais acometidos podem apresentar sinais clínicos como abortos, diminuição da fertilidade, redução do número de filhotes por ninhada, mortalidade neonatal, orquite e epididimite. Além disso, os animais podem servir como reservatório do patógeno, portando a infecção por tempo indeterminado (QUINN *et al.*, 2007). Em humanos, a enfermidade também é chamada de Febre de Malta ou Febre recorrente, sendo que os sinais clínicos são variados e vão desde um resfriado até complicações no sistema nervoso, musculatura esquelética e sistema cardíaco (GALINSKA; ZAGÓRSKI, 2013).

Em humanos, o tratamento contra a brucelose tem respostas positivas com as estratégias de tratamento. O uso de antibioticoterapia para o tratamento da brucelose, necessita de antibióticos que sejam capazes de penetrar nos macrófagos e agir em ambientes ácidos, visto que a bactéria é intracelular facultativa. Além disso, recomenda-se o uso combinado de dois antibióticos concomitantes, assim diminuindo as chances de recidivas (GLOWACKA *et al.*, 2018). Em casos de cães, o tratamento é desencorajado, recomendando-se a eutanásia dos animais positivos. Isso se deve ao fato de que o tratamento costuma ser prolongado e que recidivas podem ocorrer, devendo os antibióticos serem preservados para uso em casos clínicos humanos. Além disso, os

cães podem transmitir a doença tanto para outros cães como para humanos durante o tempo (COSFORD, 2018).

O genoma de *Brucella* é composto por dois cromossomos circulares que codificam um total de 3,3 Mbp aproximadamente (MCVEY *et al.*, 2016). Apesar de haver uma homologia de cerca de 90% entre o genoma do gênero *Brucella* (MCVEY *et al.*, 2016), apresentam diferentes hospedeiros preferenciais, virulência e potencial zoonótico distintos (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020). Mesmo com uma alta similaridade genômica entre as espécies do gênero, ferramentas para genotipagem e filogenia baseadas em marcadores genômicos, como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), são ótimas ferramentas para investigações taxonômicas e epidemiológicas (VICENTE *et al.*, 2018). Apesar de haver mais de 500 genomas de *Brucella* disponíveis em bancos de dados públicos, poucos são de *B. canis*, 29 no total (dados coletados em Julho/2023) ilustrando a falta de dados acerca dessa espécie (VICENTE *et al.*, 2018).

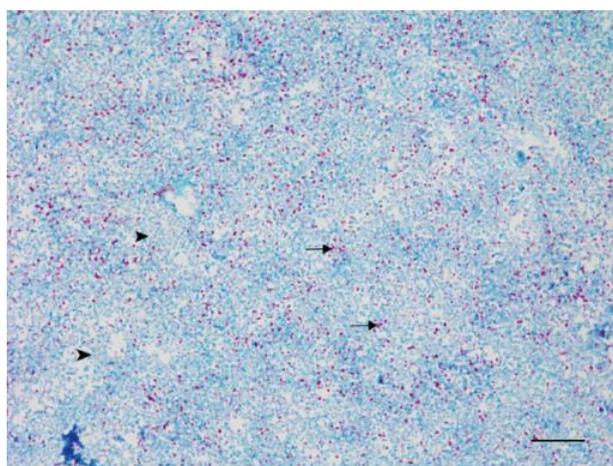
Nesse contexto, apesar de *B. canis* ser considerada uma zoonose de alto impacto tanto econômico como na saúde pública, observa-se uma carência de dados acerca do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, genômico e filogenético de cepas de *B. canis*. Sendo assim, o objetivo desse estudo é caracterizar 19 isolados de *B. canis* quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e características genômicas com suas relações filogenéticas. Com isso, espera-se aprimorar e agregar conhecimento acerca do perfil fenotípico e genômico de *B. canis*, para assim, ampliar a busca por novos alvos terapêuticos capazes de ajudar na prevenção e no tratamento de animais acometidos pela *B. canis*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Brucella*

O gênero *Brucella* é composto por bactérias gram-negativas, cocobacilares, de tamanho pequeno (0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de largura) que, na maioria das vezes, à coloração, apresentam-se de forma única, podendo também aparecer em pares ou grupo. Coram-se de vermelho com o método de Ziehl-Neelsen modificado (Figura 1), são imóveis, não encapsuladas e não formam esporos (MCVEY *et al.*, 2016; DE MASSIS *et al.*, 2022).

**Figura 1** - Coloração de Ziehl-Neelsen modificado de *Brucella canis*



Células não coradas em azul apontadas pela ponta de flecha, células coradas em rosa apontadas pelas setas. Fonte: Egloff *et al.*, 2018.

As espécies de *Brucella* são diferenciadas de acordo com sua morfologia e hospedeiro preferencial (MCVEY *et al.*, 2016). São reconhecidas atualmente as seguintes espécies que compreendem o gênero *Brucella*: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. papionis* e *B. vulpis* (GODFROID *et al.*, 2005; SCHOLZ; VERGNAUD, 2013; FIGUEIREDO *et al.*, 2015; SCHOLZ *et al.*, 2016; SEBZDA; KAUFFMAN, 2023).

A transmissão de *Brucella* costuma ocorrer via aerossóis, oral e sexual (MCVEY *et al.*, 2016). Possuem preferência por órgãos reprodutivos de animais sexualmente maduros e podem persistir por tempo indeterminado em animais, que servem como reservatório da infecção (QUINN *et al.*, 2007). Infectam os compartimentos intracelulares de células fagocíticas, retículo endoteliais e células epiteliais especializadas (MCVEY *et al.*, 2016). Os sinais clínicos mais comuns em animais acometidos pelo patógeno são abortos e problemas de fertilidade. As espécies capazes

de infectar humanos causam uma doença debilitante, chamada de Febre de Malta ou Febre recorrente (YANG *et al.*, 2016). Atualmente, as espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis* são consideradas patogênicas aos humanos (XU *et al.*, 2019).

As brucellas apresentam fatores de virulência, como envelope celular, lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e flagelinas. Esses fatores são importantes para uma ineficiente detecção do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro, gerando uma falha na resposta imune (MCVEY *et al.*, 2016). As espécies de *Brucella* podem ser divididas em dois grupos de acordo com a morfologia de suas colônias. As espécies que expressam a cadeia lateral O do LPS são chamadas de colônias de morfologia lisa, como *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* e *B. neotomae*. Enquanto as espécies que não expressam a cadeia lateral são classificadas como colônias de morfologia rugosa, como *B. ovis* e *B. canis*. Espécies com colônias de diferente morfologia utilizam diferentes métodos para adentrar células fagocíticas (MCVEY *et al.*, 2016). As brucellas de colônias lisas são consideradas mais virulentas que as de morfologia rugosa (QUINN *et al.*, 2007). Além disso, possuem um sistema de secreção tipo IV que é produzido quando em contato com ambientes acidificados, por isso, esse sistema interfere na maturação do fagossomo, sendo chamado de “brucelossomo” que se torna resistente à maturação do fagossomo e à fusão com lisossomos (MCVEY *et al.*, 2016). A habilidade de sobreviver e multiplicar-se em macrófagos representa um fator importante para a patogenicidade das brucellas, pois, ao adentrarem os macrófagos, driblam a resposta imune do hospedeiro, permitindo que ocorra a sua multiplicação e disseminação para outros tecidos (GLOWACKA *et al.*, 2018).

## **2.2 *Brucella canis***

A *B. canis* é um patógeno zoonótico de cães, considerado de difícil diagnóstico e tratamento (GUARINO *et al.*, 2023). O humano é considerado um hospedeiro ocasional (QUINN *et al.*, 2007). Além disso, canídeos selvagens, como raposas e coiotes, apresentaram titulação positiva para anticorpos do patógeno em estudos sorológicos (COSFORD, 2018).

Sua transmissão ocorre através de fluidos reprodutivos, tecidos e fluidos fetais e placenta. As vias mais comuns de contaminação são a conjuntival, genital e mucosa oronasal; enquanto as menos comuns são transfusões de sangue, cortes na pele, fezes e fômites (COSFORD, 2018). Em cadelas, morte embrionária, abortos, secreções vaginais, endometrite e filhotes saudáveis portadores do patógeno estão descritos. Em

cães machos são relatados epididimite, edema escrotal, orquite, podendo ocorrer também a atrofia testicular e problemas de fertilidade em casos crônicos. Problemas reprodutivos estão entre os sinais clínicos mais associados; porém, outros sinais clínicos podem ocorrer. Dentre os sinais clínicos não relacionados ao trato reprodutivo, uveíte, endoftalmite e discoespondilite são os mais observados, assim como sinais inespecíficos como fadiga, perda de apetite e peso (COSFORD, 2018; SEBZDA; KAUFFMAN, 2023).

O diagnóstico padrão ouro é a cultura bacteriológica a partir de amostras de sangue, urina, secreção vaginal, sêmen, fluidos de aborto e tecidos. Outros métodos de diagnóstico costumam ser realizados, como sorologia e diagnóstico molecular por PCR. Estes métodos alternativos são muito úteis dada a uma baixa sensibilidade na cultura bacteriana para a identificação de *B. canis* (COSFORD, 2018). Mesmo assim, seu diagnóstico é considerado difícil devido a oscilação na titulação de anticorpos em diferentes períodos da infecção e métodos de diagnóstico variados. Além disso, há uma certa resistência por parte dos tutores em aceitar que seu animal possa estar infectado, especialmente nos casos em que o animal não apresenta sinais clínicos (WANKE, 2004).

### **2.3 Antibioticoterapia para brucelose canina**

Assim como seu diagnóstico, o tratamento para brucelose canina é considerado laborioso, incerto e arriscado, devido ao risco de transmissão tanto para outros animais como para os humanos. Por isso, a eutanásia é indicada para cães com brucelose (COSFORD, 2018; SANTOS *et al.*, 2021; GUARINO *et al.*, 2023). Quando se opta pelo tratamento, é importante levar em conta que é um tratamento que costuma ser longo e que recidivas podem ocorrer (COSFORD, 2018; SANTOS *et al.*, 2021; SEBZDA; KAUFFMAN, 2023), não sendo este o protocolo indicado pela Organização Mundial da Saúde.

O tratamento costuma ser feito através da administração de antibióticos. Países desenvolvidos, onde a brucelose animal e humana é erradicada ou com baixíssimas ocorrências, o tratamento dos cães é aceitável. Todavia, não existe um protocolo de antibioticoterapia padronizado para o tratamento da brucelose canina (COSFORD, 2018; GUARINO *et al.*, 2023). Para a escolha dos fármacos, é importante selecionar antibióticos que sejam capazes de penetrar nos macrófagos e que mantenham sua eficácia em meios acidificados (GLOWACKA *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado uma maior eficácia no tratamento quando administrados dois ou mais antibióticos,

havendo uma maior taxa de sucesso no tratamento e uma diminuição no número de recidivas quando comparado com tratamentos usando apenas um antibiótico (COSFORD, 2018; SANTOS *et al.*, 2021). Geralmente, combina-se um antibiótico da classe das tetraciclina com um segundo da classe dos aminoglicosídeos (COSFORD, 2018). Os antimicrobianos em associação mais usados para o tratamento são doxiciclina com rifampicina, tetraciclina com estreptomicina, fluoroquinolonas ou cotrimazol associado com rifampicina, doxiciclina com estreptomicina, doxiciclina com rifampicina, doxiciclina com gentamicina (COSFORD, 2018; GLOWACKA *et al.*, 2018). Estas combinações são baseadas em dados de pacientes humanos. Após o fim da antibioticoterapia, ainda é recomendado um monitoramento sorológico dos animais por pelo menos três meses para confirmar o êxito no tratamento (DE MASSIS *et al.*, 2022).

Os testes de susceptibilidade *in vitro* de *B. canis* podem ser realizados por disco difusão (BOLOTIN *et al.*, 2020), MIC por microdiluição em caldo (MATEU-DE-ANTONIO; MARTÍN, 1995) e E-test (BAYRAM *et al.*, 2011; NETO *et al.*, 2014).

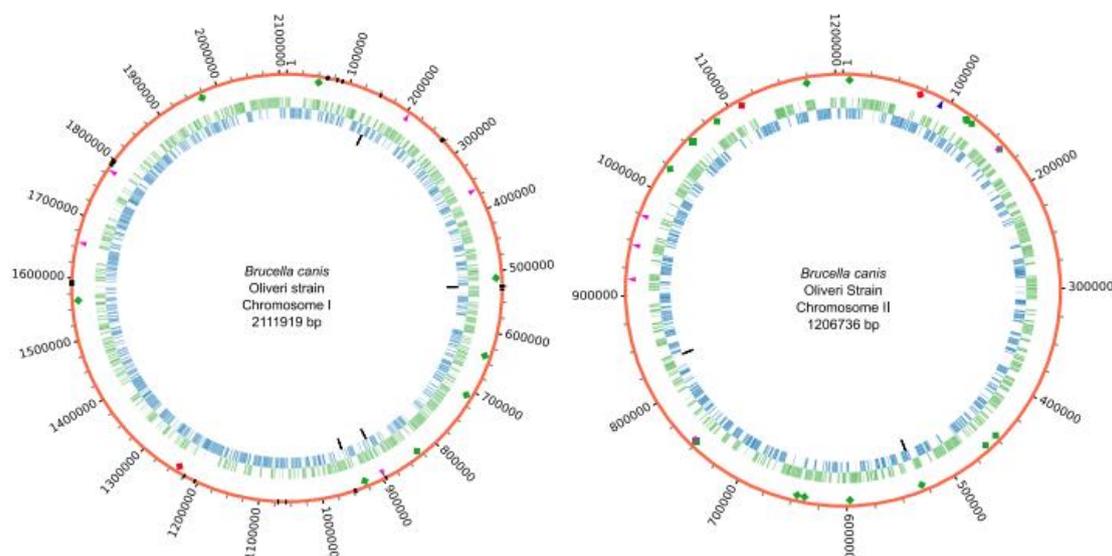
Quanto ao perfil de susceptibilidade *in vitro*, as *B. canis* costumam ser susceptíveis a doxiciclina e a tetraciclina (SANTOS *et al.*, 2021), enquanto algumas cepas de *B. canis* têm demonstrado uma maior resistência a estreptomicina e tetraciclina quando comparadas a outras espécies do gênero *Brucella* (HALL; MANION, 1970). Bolotin *et al.* (2020) demonstraram a existência de isolado de *B. canis* resistente a ceftazidima e sulfadiazina. Enquanto Hall e Manion (1970) relataram isolados de *B. canis* resistentes a estreptomicina. Além disso, estudos *in vitro* indicam atividade sinérgica entre enrofloxacin e aminoglicosídeos, assim como entre doxiciclina e estreptomicina; atividade antagonista entre doxiciclina e rifampicina também foi relatada (MATEU-DE-ANTONIO; MARTÍN, 1995).

#### **2.4 Características dos genomas do gênero *Brucella***

A maioria das brucellas possuem dois cromossomos circulares que codificam, aproximadamente, 2,1 e 1,2 Mbp, totalizando um genoma de ~3,3 Mbp (Figura 2). A origem do grande cromossomo é considerada típica de cromossomos bacterianos e a do pequeno cromossomo semelhante à de plasmídeos (MCVEY *et al.*, 2016). Seu genoma é considerado conservado e estável (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020), contando com uma variedade de inserções e deleções, assim como recombinações (O'CALLAGHAN; WHATMORE, 2011) apresentando um conteúdo G+C quase idêntico entre os dois cromossomos, variando entre 58 e 59% (MCVEY *et al.*, 2016). Além disso, não há evidência de plasmídeos, transferência horizontal gênica, fagos lisogênicos ativos ou

algum evento recente de recombinação externa, o que exclui a possibilidade de aquisição de material genético exógeno (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020).

**Figura 2** - Mapa circular exibindo os cromossomos I e II de *Brucella canis* cepa Oliveri



Fonte: Sánchez-Jiménez *et al.*, 2015.

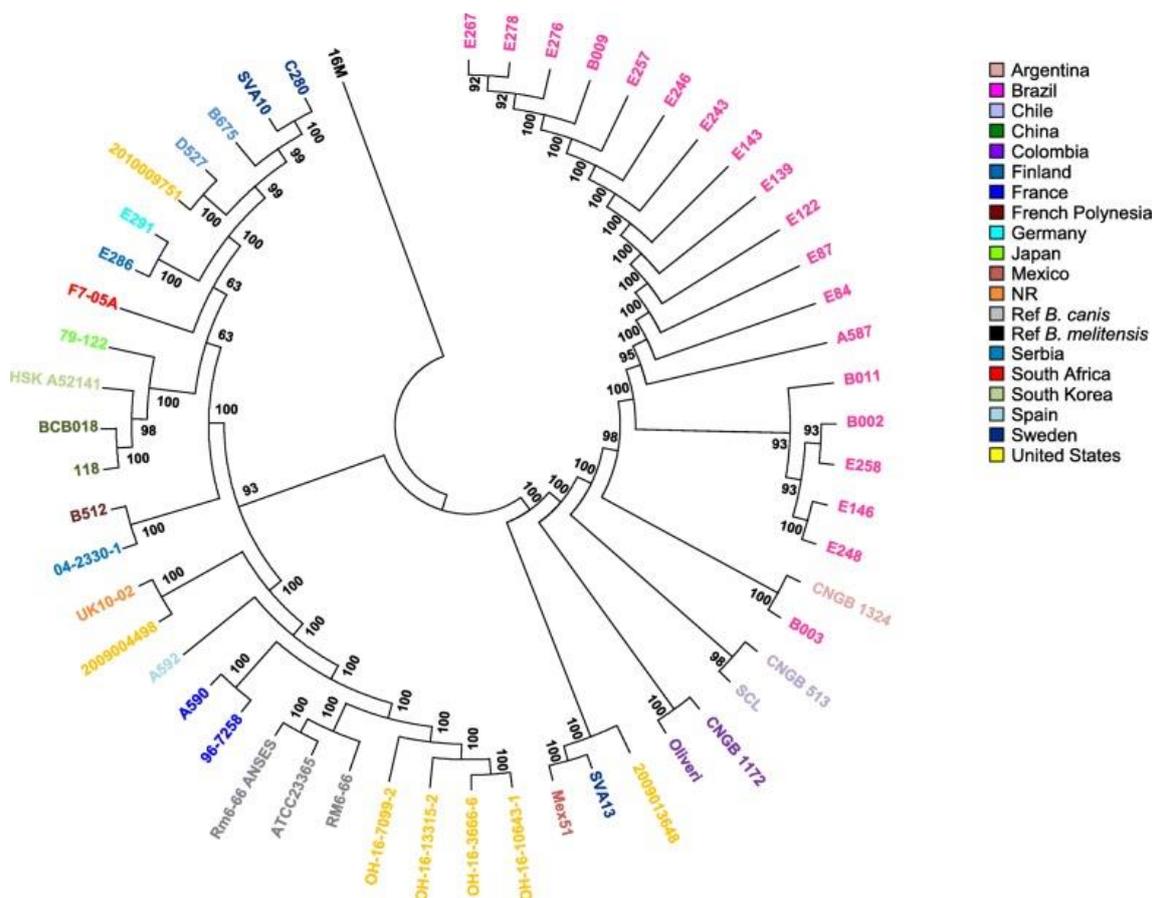
O gênero se mostra altamente homogêneo, com estudos pareados de DNA/DNA exibindo uma homologia de mais de 90% em todas as espécies, tendo as espécies *B. abortus* e *B. melitensis* mais estreitamente relacionadas. Ademais, as espécies *B. canis* e *B. suis* também possuem uma estreita relação filogenética. Por outro lado, *B. neotomae* e *B. ovis* apresentam o maior nível de divergência genômica entre as espécies de brucellas (MCVEY *et al.*, 2016). Apesar dessa grande homologia, as espécies apresentam diferentes hospedeiros preferenciais, virulência e potencial zoonótico (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020).

Interessantemente, foram identificados apenas 7 mil polimorfismos em 3,1MB de sequências genômicas compartilhadas entre as espécies de *Brucella* (MCVEY *et al.*, 2016). Pelo fato de, durante milhares de anos, a interação muito próxima entre as brucellas e as células de seus hospedeiros tenha rearranjado o seu genoma, é provável que tenha gerado uma espécie de redução no fluxo gênico, favorecendo a redução e a simplificação dos genes, incluindo a eliminação de genes acessórios. Apesar disso, os elementos genéticos necessários para a adaptação ao hospedeiro foram mantidos ou modificados, através de mutações, inversões, translocações e inserção/ deleção de transposons. Diversas estruturas ortogonais, como o sistema de secreção tipo IV, o lipopolissacarídeo, as moléculas do envelope celular e alternativas metabólicas necessárias para a virulência e a vida intracelular de *Brucella* foram adquiridas e então

remodeladas, juntamente com a característica furtiva de driblar o sistema imune do hospedeiro. A aquisição de genes através da duplicação, mutação e reorganização de elementos genéticos móveis, como sequências de inserção, permitiu uma certa diversidade entre espécies de *Brucella*. Genes codificantes como a cadeia lateral O da LPS, flagelo funcional, fímbrias e algumas rotas metabólicas variam entre as espécies de brucellas. Ilhas genômicas (IGs) e regiões anômalas compartilhadas também são espécie-específica (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020).

O uso de técnicas como *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e busca genômica de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) permitem a genotipagem e caracterização filogenética de bactérias. O emprego dessas ferramentas permite o agrupamento em clusters de cepas de acordo com a sua localização geográfica e sua história evolutiva, além do rastreamento de focos de infecção e a sua distribuição global, mostrando-se ferramentas epidemiológicas importantes (SUÁREZ-ESQUIVEL *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2022). Com o uso de MLST e busca por SNPs já foi possível determinar, com os genomas disponíveis, que mundialmente, as cepas de *B. canis* são separadas em duas linhagens distintas e em diferentes subclados (Figura 3). A primeira linhagem é composta majoritariamente por *B. canis* isoladas da Europa, Ásia e Estados Unidos, enquanto a segunda linhagem de países da América do Sul, México, Estados Unidos e Suécia (VICENTE *et al.*, 2018).

Figura 3 - Árvore filogenética construída a partir de *single nucleotide polymorphisms* de 53 cepas de *Brucella canis*



Fonte: Vicente *et al.*, 2018.

Até o momento (Julho/2023) 29 genomas completos de *B. canis* foram sequenciados e disponibilizados nos bancos de dados. Estes genomas apresentam, em média, um tamanho total de 3,2 Mbp, conteúdo G+C de 57,2%, ~3.000 regiões codificantes (CDS) (KIM *et al.*, 2012; KADEN *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2017; GIRAULT *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019; GALARCE *et al.*, 2020). Seu genoma contém, aproximadamente, 3.000 *open reading frames* (ORFs), 55 tRNA e 9 rRNA (KIM *et al.*, 2012; VIANA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2019). Comparativamente a outras bactérias e até a outras espécies do gênero *Brucella*, este número é extremamente baixo, o que dificulta a realização de estudos robustos para ampliar o conhecimento sobre a patogênese de *B. canis*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, genômico e filogenético de isolados de *B. canis*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a susceptibilidade dos isolados de *B. canis*;
- Sequenciar seus genomas;
- Anotar os genomas e procurar *in silico* genes de resistência e virulência;
- Construir árvore filogenética.

#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

A descrição dos experimentos realizados, os resultados obtidos, bem como a discussão dos mesmos serão apresentados na forma de artigo científico. Neste item é apresentada a versão em inglês do artigo “Phenotypic and phylogenetic characterization of *Brucella canis* strains”.

## 5 CONCLUSÕES

- Pela primeira vez foi realizada a montagem genômica híbrida de *Brucella canis*, pelo uso de sequenciamento por HiSeq e Nanopore.
- A detecção de dois genes de resistência a antimicrobianos em todos os isolados desse estudo pode revelar uma tendência quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para os isolados da região sul do Brasil.
- As análises filogenéticas revelaram o predomínio do *sequence type 20* (ST20) entre os isolados desse estudo e a presença de duas linhagens distintas baseado em *single nucleotide polymorphism* (SNP) ao analisar isolados de diferentes países.
- Os isolados desse estudo apresentaram um perfil de susceptibilidade a antimicrobianos parecido, mesmo tendo uma diferença de até 20 anos entre eles. Acreditamos que este resultado seja devido à baixa exposição a antimicrobianos que esses isolados foram submetidos, visto que, cães com brucelose não são tratados no Brasil.

## **6 PERSPECTIVAS**

- Aprofundar análises genômicas em busca de mais genes de virulência e patogenicidade, como genes envolvidos no sistema de secreção e de captação de ferro.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC) dos isolados frente a outros antimicrobianos de outras classes, como das fluoroquinolonas e dos macrolídeos.
- Realizar ensaios de formação de biofilme para observar o perfil dos isolados.

## REFERÊNCIAS

- BAYRAM, Y. *et al.* Antimicrobial Susceptibilities of *Brucella* isolates from various clinical specimens. **International Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 198-202, 2011.
- BOLOTIN, V. I. *et al.* First report of canine brucellosis in Ukraine: pathogen isolation and characterization. **Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety**, v. 6, n. 4, p. 5-8, 2020.
- COSFORD, K. L. *Brucella canis*: an update on research and clinical management. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 74-81, 2018.
- DE MASSIS, F. *et al.* Canine brucellosis due to *Brucella canis*: description of the disease and control measures. **Veterinaria Italiana**, v. 58, n. 1, p. 5-23, 2022.
- EGLOFF, S. *et al.* *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 160, n. 12, p. 743-748, 2018.
- FIGUEIREDO, P. *et al.* Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1505-1517, 2015.
- GALARCE, N. *et al.* Prevalence and genomic characterization of *Brucella canis* strains isolated from kennels, household, and stray dogs in Chile. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2073, 2020.
- GALINSKA, E. M.; ZAGÓRSKI, J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 2, p. 233-238, 2013.
- GIRAULT, G. *et al.* Genome sequences of five *Brucella canis* strains isolated from different countries throughout the world. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 14, 2018.
- GLOWACKA, P. *et al.* *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 151-161, 2018.
- GODFROID, J. *et al.* From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 313-326, 2005.
- GUARINO, C. *et al.* Antibody response over time correlated with treatment outcome in 30 dogs naturally infected with *Brucella canis* (2017-2022). **American Journal of Veterinary Research**, v. 84, n. 4, 2023.
- HALL, W. H.; MANION, R. E. In vitro susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. **Applied Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 600-604, 1970.
- HENSEL, M. E. *et al.* Brucellosis in dog and public health risk. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 8, p. 1401-1406, 2018.
- KADEN, R. *et al.* Whole-genome sequence of *Brucella canis* strain SVA13, isolated from an infected dog. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, 2014.

KIM, J. S. *et al.* Complete genome sequence of *Brucella canis* strain HSK A52141, isolated from the blood of an infected dog. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 5134, 2012.

MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTÍN, M. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 1995.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. *Brucella*. In: OLSEN, S.; BELLAIRE, B. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 15, p. 213.

NETO, A. M. *et al.* Antimicrobial susceptibility profile of *Brucella* spp. isolated in Brazil. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 163-172, 2014.

OSMAN, A. Y. *et al.* The epidemiology and immunopathophysiology of brucellosis in small ruminant. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 11-21, 2016.

O'CALLAGHAN, D.; WHATMORE, A. M. *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. **Briefings in Functional Genomics**, v. 10, n. 6, p. 334-341, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E. DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. Gênero *Brucella*. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. cap. 28, p. 162-171.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M. M. *et al.* Comparison of *Brucella canis* genomes isolated from different countries shows multiple variable regions. **Genomics**, v. 106, n. 1, p. 43-51, 2015.

SANTOS, R. L. *et al.* Canine Brucellosis: an update. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8:594291, 2021.

SCHOLZ, H. C. *et al.* *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2090-2098, 2016.

SCHOLZ, H. C.; VERGNAUD, G. Molecular characterisation of *Brucella* species. **Revue Scientifique et Technique**, v. 32, n. 1, p. 148-162, 2013.

SEBZDA, M. K.; KAUFFMAN, L. K. Update on *Brucella canis*: understanding the past and preparing for the future. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, S0195-5616(23)00075-X, 2023.

SUÁREZ-ESQIVEL, M. *et al.* *Brucella* genomics: macro and micro evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, 2020.

VIANA, M. V. *et al.* Genome sequences of three *Brucella canis* strains isolated from humans and a dog. **Genome Announcements**, v. 5, n. 8, p. e01688-16, 2017.

VICENTE, A. F. *et al.* New insights into phylogeography of worldwide *Brucella canis* isolates by comparative genomics-based approaches: focus on Brazil. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 636, 2018.

WANKE, M. M. Canine brucellosis. **Animal reproduction Science**, v. 82-83, p. 195-207, 2004.

XU, G. *et al.* Complete genome sequence of *Brucella canis* GB1, a strain isolated from a poodle in Beijing, China. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 2, 2019.

YAN, G. *et al.* First isolation and multilocus sequence typing of *Brucella canis* from a subclinically infected pet dog in China. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 1, p. 22, 2022.