

## Tipificação de *Brucella* por “Bruce-Ladder”

*Brucella* sp. são os agentes causadores da brucelose, doença que afeta diversas espécies de animais e o homem, causando doenças crônicas nestes e diversas perdas econômicas, pelo fato de causar aborto e infertilidade nos animais de produção. Apesar da identificação de diferentes espécies dentro do gênero, o gênero tem sido descrito como geneticamente homogêneo. Técnicas moleculares têm sido empregadas com o intuito de diferenciar e tipificar estes microrganismos. O uso de um teste rápido e eficiente é de essencial importância para programas de erradicação da brucelose, rastreamento epidemiológico e, também, para a diminuição dos riscos de contaminação dos que manipulam a bactéria. García-Yoldi e colaboradores desenvolveram um ensaio PCR-multiplex (Bruce-Ladder), que é capaz de tipificar quase todas as espécies de *Brucella*. Este trabalho tem por objetivo reproduzir a PCR-multiplex ‘Bruce-Lader’ a fim de comprovar a sua reprodutibilidade, confirmar a identificação bacteriológica clássica das cepas de *Brucella* sp. pertencentes à bacterioteca do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e testar modificações a fim de torná-la eficiente para identificação ao nível de biovar. Inicialmente foi utilizada a cepa *B. melitensis* (biovar 2, cepa 63/9), para reproduzir o teste e otimizar as concentrações de diferentes reagentes: i)  $MgCl_2$  (2, 2,5, 3, 3,5 e 4mM); ii) DNA (600, 300 e 150ng) e iii) polimerase (0.5, 1.0 e 1.5U). Observamos uma melhor visualização dos fragmentos de DNA utilizando 3,5mM  $MgCl_2$ , DNA na concentração de 150ng e 1.5U de polimerase. Após otimizada a reação, utilizamos *B. Melitensis* (biovar 2 63/9), *B. suis*(SEA), *B. Canis*(RM 6/66), e *B. abortus*(biovar 2 86/08/59), para testar a reprodutibilidade da técnica. Dois fragmentos esperados (1,682 e 1,071bp) não foram visualizados, mesmo com alterações de temperaturas de anelamento (64, 62, 60, 58, 56, 54, 52 e 50°C). Novos testes estão sendo executados com os mesmos oligonucleotídeos para a verificação da presença destes fragmentos. Apoio: PIBIC-CNPq.