

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Brucella* spp. UTILIZANDO
A TÉCNICA DE BOX-PCR**

Patrícia Bender
Bióloga – UFRGS

Maio de 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Brucella* spp.
UTILIZANDO A TÉCNICA DE BOX-PCR**

Patrícia Bender
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS)
Maio de 2003

ASSINATURAS

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa da Costa pela orientação.

Ao Dr. José Carlos Germani pelo apoio e “acolhimento”.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelas críticas e sugestões.

Às amigas Margaroni F. de Oliveira e Anelise B. da Silveira pela ajuda indispensável na realização deste trabalho, apoio e amizade.

Os colegas de curso e amigos Neida Macedo e Luíz Gustavo Borges pelas sugestões e amizade.

Aos demais colegas de curso e laboratório por terem sido simplesmente amigos nos momentos certos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia.

Aos meus pais pelo apoio, confiança e carinho.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Brucella* spp. UTILIZANDO A TÉCNICA DE BOX-PCR^{1/}

Autora: Patrícia Bender
Orientadora: Marisa da Costa
Co-orientador: José Carlos Germani

RESUMO

O gênero *Brucella* é formado por coco-bacilos Gram negativos patogênicos ao homem e animais, sendo classificado como patógeno de grupo de risco III. A identificação dessas bactérias apresenta várias limitações como: exigência de inoculação em vários meios, tempo de incubação longo e necessidade de soros imunes e bacteriófagos. Devido à sua alta patogenicidade e ao longo tempo de exposição dos laboratoristas à bactéria, a brucelose é uma das infecções mais frequentemente adquiridas em laboratório. Além da contaminação em laboratório, a transmissão ao homem pode ocorrer através de animais infectados e ingestão de produtos derivados, como o leite cru. A procura de métodos rápidos de identificação das espécies e biovars pode ser útil para diminuir os riscos do manuseio desta bactéria e na tomada de medidas de controle epidemiológico. O principal objetivo deste trabalho foi facilitar a classificação de cepas de referência de *Brucella* spp. e isoladas no Brasil utilizando a técnica de rep-PCR com oligonucleotídeos do elemento BOX, uma seqüência repetida presente no genoma de várias bactérias. Foram analisados 38 isolados representando diferentes espécies e biovars de *Brucella* sp. e 13 isolados de gêneros relacionados como controle da especificidade da reação. Foi realizada uma confirmação prévia dos isolados de brucela por testes bioquímicos e PCR gênero-específica. A técnica de BOX-PCR agrupou todas as espécies e biovars de *Brucella* em um único grupo com nível de similaridade entre 100 e 74%. Diferenças entre os isolados, quanto a presença ou ausência de bandas, puderam ser observadas. Entretanto, essas divergências não caracterizam uma espécie ou biovar. Bandas comuns a todos os isolados de *Brucella* sp. podem caracterizar o gênero.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Biologia Molecular de Microrganismos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Abril (2003)

MOLECULAR TYPING OF *Brucella* spp. STRAINS USING BOX-PCR

Autor: Patrícia Bender
Adviser: Marisa da Costa
Co-adviser: José Carlos Germani

ABSTRACT

The genus *Brucella* comprises a group of Gram-negative bacteria pathogenic to mammals and are labeled as Class III in the hazard classification. There are many difficulties to identify them: the need of many media for inoculation, they are slow growing, and there is a need of immune-serum and phage typing. *Brucella* sp. is the principal bacteria responsible for acquired infection in laboratories. Other sources of infection are through the contact with infected animals and ingestion of raw milk and its derivatives. The search for rapid and safe methods to identify this bacteria on the level of species or biovars would decrease the risk of infection and accelerate its control. The aim of this work was to use a BOX-PCR technique for the identification of *Brucella* spp. using references and Brazilian strains. We analyzed 38 *Brucella* strains and 13 bacteria with are important to test the specificity of this technique. All *Brucella* strains were previously identified by classical microbiological identification and by genus-specific PCR. The BOX-PCR regrouped all *Brucella* sp. into one group between 100 and 74% similarity. Differences between strains could be observed by the presence or absence of some fragments. However, it was not possible to differentiate each species or biovar because of the differences. All *Brucella* strains showed common fragments among them and can be used for the characterization of the genus.

^{1/}Master of Science Dissertation in Environmental and Agrigultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. April (2003)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Introdução	15
2.2. O gênero <i>Brucella</i>	17
2.3. Isolamento e identificação de <i>Brucella</i> spp. no Brasil	17
2.4. Isolamento e identificação de <i>Brucella</i> spp. pela bacteriologia clássica	18
2.5. Característica do genoma das <i>Brucella</i> sp.	20
2.6. Tipificação molecular de <i>Brucella</i> sp.	21
2.7. Identificação de <i>Brucella</i> spp. por PCR	26
2.8. Técnica de PCR baseada em seqüência repetitivas (Rep-PCR)	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Local de execução do estudo	32
3.2. Medidas de segurança em laboratório durante a manipulação das brucelas vivas	32
3.3. Isolados utilizados	33
3.4. Cultivo e confirmação bioquímica do gênero <i>Brucella</i>	35
3.5. Extração de DNA	37
3.6. Análises quantitativas e qualitativas do DNA	38
3.7. Confirmação em nível molecular do gênero <i>Brucella</i>	39
3.8. Tipificação molecular de <i>Brucella</i> spp. através da técnica de reação em cadeia da polimerase	39
3.8.1. Oligonucleotídeo iniciador	39
3.8.2. Padronização as condições de amplificação	40
3.8.2.1 Testes realizados a partir do protocolo de Versalovic et al. (1994) .	40
3.8.2.2 Testes realizados a partir do protocolo de Alippi & Agilar (1988) ...	42
3.8.2.3 Outras modificqções realizadas no protocolos de Versalovic et al. e Alippi e Aguilar (1988)	43
3.9. Eletroforese em gel de agarose	43
3.10. Análise dos resultados	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Confirmação bioquímica de <i>Brucella</i> sp.	45

4.2.	Confirmação molecular de <i>Brucella</i> sp.	51
4.3.	BOX-PCR	53
4.3.1.	Protocolo de BOX-PCR utilizado	53
4.3.2.	Padronização da reação	54
4.4.	Fragmentos obtidos por BOX-PCR	58
4.5.	Dendrogramas	66
4.5.1.	Análise do dendrograma baseado nos resultados dos testes bioquímicos de <i>Brucella</i> sp.	66
4.5.2.	Análise do dendrograma baseado em análises de BOX-PCR de <i>Brucella</i> sp. e gêneros relacionados	67
5.	CONCLUSÕES	72
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8.	APÊNDICES	85

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Hospedeiros preferenciais de <i>Brucella</i> spp.	16
2. Linhagens de referência de <i>Brucella</i> utilizados nos experimentos	34
3. Isolados de campo de <i>Brucella</i> utilizados nos experimentos	35
4. Isolados de outros gêneros utilizados nos ensaios de especificidade ...	36
5. Concentração de MgCl ₂ , β-mercaptoetanol e DMSO dos tampões preparados em laboratório e do tampão descrito por Versalovic et al. (1994).....	41
6. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de <i>B. abortus</i>	45
7. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de <i>B. suis</i> de referência.....	46
8. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de <i>B. melitensis</i> de referência.....	47
9. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de <i>B. canis</i>	48
10 Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de <i>B. ovis</i> e <i>B. neotomae</i>	49
11. Relação entre isolados de <i>B. abortus</i> e fragmentos amplificados por BOX-PCR.....	62
12. Relação entre isolados de <i>Brucella</i> spp. e fragmentos amplificados por BOX-PCR.	63
13. Fragmentos amplificados em <i>Brucella</i> sp. por BOX-PCR comuns a outros gêneros bacterianos.	65

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Confirmação do gênero <i>Brucella</i> e a especificidade da reação com o par de oligonucleotídeos Bruc 887/1457.....	52
2. Perfis de BOX-PCR	60
3. Perfis de BOX-PCR	64
4. Dendrograma baseado nos resultados dos testes bioquímicos de <i>Brucella</i> sp.	66
5. Dendrograma baseado em BOX-PCR em isolados de <i>Brucella</i> sp. e gêneros relacionados.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI: infusão cérebro e coração

BSA: albumina bovina

CF: concentração final

DMSO: dimetil sulfóxido

IS: seqüência de inserção

OMP: proteína de membrana externa

PCR: reação em cadeia da polimerase

RFLP: polimorfismo no comprimento do fragmento digerido

TBE: tampão Tris-Borato-EDTA

TE: tampão Tris-EDTA

SDS: dodecil sulfato de sódio

UV: ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* é formado por bactérias Gram-negativas que são patogênicas ao homem e animais. Esta bactéria não é muito exigente em termos nutricionais, mas existem algumas limitações quanto à sua identificação. Estas limitações estão relacionadas:

1. com a exigência de vários repiques da mesma amostra em diferentes meios de cultura para sua identificação aumentando o risco de contaminação pelo laboratorista.
2. com o tempo de crescimento que é relativamente longo comparado às outras bactérias, pois elas necessitam de, no mínimo, 48 horas para o crescimento, sendo o período médio para a identificação de uma semana.
3. com a dificuldade de obter reativos especiais para sua identificação, tais como soros imunes e bacteriófagos.
4. com a necessidade de trabalho constante com culturas de *Brucella* spp. para a manutenção de fagos.

A procura de outras alternativas para a identificação das espécies e biovars pode ser útil no controle da infecção causada por esta bactéria. A identificação precisa do agente indica aos clínicos e veterinários, bem como a outros profissionais em saúde pública, as eventuais fontes de infecção e as espécies envolvidas nas diferentes regiões do país, facilitando a tomada de medidas para sua prevenção e controle.

Este gênero causa uma infecção de distribuição mundial, importante para a saúde pública e na produção animal. As brucelas são classificadas como patógenos de grupo de risco III. Isso indica alto risco de contaminação aos trabalhadores, sendo uma das infecções mais frequentemente adquiridas em laboratório. Os graus de risco variam, não somente com a virulência do microrganismo, mas também com o número de bactérias no material manuseado. Além da contaminação em laboratório, a transmissão ao homem ocorre através de animais infectados e da ingestão de produtos alimentícios não tratados, como o leite cru e seus derivados. A infecção por este microrganismo também pode ocorrer durante o processamento de alimentos, principalmente da carne.

Um grande progresso na Microbiologia tem sido alcançado em decorrência da incorporação de métodos de biologia molecular, como complemento às técnicas clássicas até então utilizadas. A associação de técnicas novas às técnicas já disponíveis aumenta o potencial de diagnóstico e do controle de infecções de agentes como a *Brucella* sp., e também do conhecimento de sua estrutura, favorecendo a compreensão de certos determinantes de patogenicidade.

Tendo em vista as dificuldades associadas à identificação das bactérias do gênero *Brucella* pelos métodos convencionais, o presente trabalho teve como objetivo geral, a obtenção de testes de identificação de cepas de *Brucella* mais frequentes no nosso meio, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para serem incorporados na rotina de identificação de amostras desse gênero. Como objetivos específicos: a) propor um método

rápido de identificação das espécies, biovares e cepas isoladas no Brasil, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos da seqüência BOX; b) confirmar a tipificação das cepas já isoladas e identificadas pelos métodos convencionais; c) ampliar o conhecimento do genoma das *Brucella* spp.

A importância desse trabalho reside na possibilidade de facilitar a identificação das espécies e cepas de *Brucella* spp. A maior rapidez na detecção bem como na distinção entre biovares e cepas deste gênero facilitaria as pesquisas epidemiológicas e a estruturação de medidas de controle dessa zoonose. Outro aspecto importante é a diminuição do risco de contaminação pelos laboratoristas devido à diminuição no número de manipulações com a bactéria viva. A melhora da identificação aumenta a rapidez do controle dessa infecção, diminuindo o risco de contaminação de animais, seus derivados e do homem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução

A brucelose tem diferentes denominações, como febre de Malta, Melitococcia, febre mediterrânea, febre de Gibraltar (no homem), febre abortiva, doença de Bang, aborto epizootico ou contagioso (animal) e epididimite contagiosa dos carneiros (Acha & Szyfres, 1989). A primeira descrição clínica da doença no homem foi publicada por Martson em 1859 e foi chamada febre mediterrânea (Roux, 1989). Mas foi só em 1887 que Bruce isolou o agente e deu o nome de *Micrococcus melitensis* (Gillespie & Timoney, 1981 e Roux, 1989). No Brasil, o primeiro caso de brucelose foi comprovado sorologicamente na Faculdade de Medicina de Porto Alegre em 1913 (Poester, 1984).

A brucelose provoca grandes perdas econômicas devido, principalmente, aos abortos, aos problemas reprodutivos e à queda de produção causados por *Brucella* sp. (Leal-Klevezas et al., 1995).

O gênero *Brucella* apresenta seis espécies, classificadas pelo conjunto de provas bioquímicas, sorológicas, sensibilidade a fagos e metabolismo oxidativo. Esta classificação resulta na divisão de algumas espécies em biovars. As espécies *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* são compostas por sete, três e cinco biovars, respectivamente. *B. neotomae*, *B. canis* e *B. ovis* não apresentam biovars (Alton et al., 1988). Duas espécies, *B.*

canis e *B. ovis*, apresentam colônias com aspecto rugoso e não apresentam a cadeia O no lipopolissacarídeo da membrana externa (Alton et al., 1988).

Cada espécie de *Brucella* sp. tem hospedeiros preferenciais, mas todas podem infectar outros animais e algumas delas podem infectar o homem (Tabela 1). As espécies que não infectam o homem são: *B. neotomae* e *B. ovis* (Alton et al., 1988).

Tabela 1. Hospedeiros preferenciais de *Brucella* spp.

Espécie	Hospedeiros preferenciais
<i>B. melitensis</i>	ovelhas e cabras
<i>B. abortus</i>	gado
<i>B. suis</i>	porcos, lebres, renas, roedores
<i>B. neotomae</i>	roedores do deserto americano
<i>B. canis</i>	cães
<i>B. ovis</i>	ovelhas

Muitos isolados de *Brucella* têm sido obtidos de mamíferos marinhos. Esses isolados são distintos das seis espécies de *Brucella* reconhecidas por características fenotípicas e moleculares (Verger et al., 2000; Cloeckaert et al., 2001). Dessa maneira é proposta a inclusão de uma nova espécie dentro do gênero *Brucella*, apesar de ainda não existir um nome oficial para as brucelas isoladas de mamíferos marinhos (Cloeckaert et al., 2002).

2.2. O Gênero *Brucella*

As *Brucella* spp. são coco-bacilos Gram negativos classificados no mesmo sub-grupo das *Proteobacteria* divisão α -2 (Moreno et al., 1990; Stackebrandt et al., 1988). Este sub-grupo contém bactérias que vivem em estreita associação com células eucarióticas vegetais e animais, como *Agrobacterium radiobacter*, *Phyllobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Ochrobactrum anthropi* e *Bartonella* spp. As duas últimas espécies citadas são patogênicas ao homem e são isoladas em certos tipos de amostras clínicas utilizadas para o isolamento das *Brucella* spp. (De Ley et al., 1987; Moreno et al., 1990).

As bactérias do gênero *Brucella* são arranjadas aos pares ou em pequenos grupos, quando visualizadas após a coloração de Gram. O comprimento da célula varia de 0,6 μm a 1,5 μm e a largura varia de 0,5 μm a 0,7 μm . São aeróbias, mas algumas espécies necessitam de ambiente de microaerofilia para seu crescimento. As colônias são visíveis em meio nutriente sólido após três dias de incubação, medindo 1 – 2 mm de diâmetro com bordas lisas, translúcidas e de cor branca (Alton et al., 1988; Holt et al., 1994).

2.3. Isolamento e identificação de *Brucella* spp. no Brasil

A brucelose bovina causada por *B. abortus* é a infecção por *Brucella* mais prevalente no Brasil, seguida por *B. suis* em porcos. *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isoladas no país (Poester et al., 2002). A presença de *B. melitensis* no território brasileiro não foi comprovada (Garcia-Carrillo, 1987; INPPAZ, 1994). Na América do Sul, esta espécie está presente na Argentina e

Perú (INPPAZ, 1994). No Brasil, já foram isolados *B. abortus* (biovars 1, 2, 3 e 6), *B. canis*, *B. ovis* e *B. suis* (biovar 1) (Garcia-Carrillo, 1987; INPPAZ, 1994). Foram isoladas de humanos, uma cepa de *B. suis* (INPPAZ, 1994) e uma cepa de *B. abortus* (Santos Neto et al., 1999), sendo que os biovars não foram identificados. Atualmente, nenhum laboratório no Brasil é capaz de realizar todos os testes necessários para a identificação de brucelas até biovar, pois estes locais não possuem todos os reativos ou aparelhos especiais necessários, como soros específicos, bacteriófagos e metabolismo oxidativo.

2.4. Isolamento e identificação de *Brucella* spp. pela bacteriologia clássica

O isolamento das *Brucella* spp. é o método mais específico que existe embora seja mais complexo na realização. A sensibilidade depende de vários fatores como o tipo e o número de tecidos utilizados para o isolamento, do tempo da coleta de material após a infecção e dos métodos de isolamento utilizados. Esta técnica exige pessoas bem treinadas e instalações adequadas para o trabalho com germes altamente infecciosos como são as *Brucella* spp. (Alton et al., 1988).

O meio sólido é o preferido para o isolamento deste microrganismo exceto para cultura de sangue. A cultura em meio sólido facilita o reconhecimento das colônias de *Brucella* spp. e limita a interferência de microrganismos contaminantes de crescimento mais rápido. Entretanto, o meio líquido é utilizado para a cultura de amostras clínicas onde o número de bactérias é muito pequeno, como sangue e tecidos (Alton et al., 1988).

O meio nutriente utilizado para o isolamento de *Brucella* é composto de peptona, cloreto de sódio, extrato de carne, água e ágar. Para o isolamento primário, a partir de produtos biológicos são acrescentados ao meio seletivo, para algumas espécies, cicloheximida, bacitracina, polimixina B, vancomicina, ácido nalidíxico e nistatina (Alton et al., 1988). Algumas amostras exigem CO₂, soro, tiamina, nicotinamida e biotina nos meios de cultura para estimular seu crescimento que é lento (Alton et al., 1988; Holt et al., 1994).

As bactérias do gênero *Brucella* estão, freqüentemente, em pequeno número nas amostras, por isso as chances de isolamento do microrganismo podem ser aumentadas pelo número de placas inoculadas por amostra ou pela utilização do meio seletivo bi-fásico (meio que consiste de uma fase sólida e uma fase líquida em um mesmo frasco). O tempo de incubação, a forma de cultivo e inoculação dependem da amostra utilizada, a saber:

1. Sangue: é melhor em meio líquido ou meio bi-fásico. O desenvolvimento de colônias pode levar mais de 35 dias;
2. Leite: deve ser centrifugado. A gordura (sobrenadane) e os sedimentos são semeados separadamente em meio sólido;
3. Outros líquidos: conteúdo de estômago fetal, sêmen, etc. podem ser semeados diretamente em meio sólido;
4. Tecidos: devem ser macerados com um pouco de meio de cultura líquido. O caldo é então semeado diretamente em meio sólido;

Após o isolamento da bactéria a partir do material biológico, são necessários os testes bioquímicos para a confirmação do gênero. O gênero *Brucella* apresenta resultado positivo para os testes de catalase, oxidase e

urease, de redução de nitrato e resultado negativo para citrato, gelatina, produção de indol e acetilmetilcarbinol. A identificação da espécie é feita através de lise por fagos e metabolismo oxidativo (utilização de aminoácidos e carboidratos específicos). Para *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, a identificação até biovar necessita de quatro testes: requerimento de dióxido de carbono (CO₂), produção de gás sulfídrico (H₂S), sensibilidade a corantes e aglutinação com soros específicos. Estes testes necessitam de 4 a 5 dias para evidenciarem os resultados (Alton et al., 1988; Holt et al., 1994).

2.5. Característica do genoma das *Brucella* spp

O membros do gênero *Brucella* merecem atenção especial por apresentarem, dentro da mesma espécie, isolados com dois cromossomos e outros com um (Moreno, 1998). As espécies de *Brucella*, com exceção de alguns isolados de *B. suis*, possuem dois cromossomos de aproximadamente 2,1X10⁶ e 1,15X10⁶ pb. Entre as exceções, *B. suis* biovar 2 e 4 possuem dois cromossomos de 1,85X10⁶ e 1,35X10⁶ pb e *B. suis* biovar 3 tem apenas um cromossomo de 3,1X10⁶ pb (Jumas-Bilak et al., 1998).

Análises de hibridização de DNA-DNA mostram que o gênero *Brucella* é monoespecífico. Em nível de DNA, as espécies têm acima de 90% de identidade nos ensaios de hibridização, sendo proposta uma única espécie dentro do gênero: *Brucella melitensis* (Verger et al., 1985). Entretanto, alguns estudos mostram certa variabilidade no DNA das brucelas capaz de diferenciar espécies e alguns biovares, como descrito no ítem 2.6.

A estrutura genômica de muitos isolados de *Brucella* spp. exibem padrões específicos de macro-restrição por digestão do DNA genômico com *Xba*I, com pequenas variações entre biovares dentro de uma espécie (Allardent-Servent et al., 1988). Seis mapas de restrição com *Pac*I e *Spe*I foram estabelecidos para as seis espécies do gênero *Brucella*. A comparação dos mapas mostrou sítios de restrição altamente conservados entre os genomas das espécies, com numerosas pequenas inserções e deleções com tamanhos variando entre 1 kb e 32 kb (Michaux-Charachon et al., 1997).

Uma característica constante do genoma de *Brucella* é a ausência de plasmídios e fagos temperados, não havendo evidências de transferência de material genético na natureza (Michaux-Charachon et al., 2002). Em ensaios de transferência de plasmídeos, estes parecem ser estáveis e facilmente transferidos aos membros do mesmo gênero ou mesmo para *E. coli* (Rigby & Fraser, 1989; Halling et al., 1991; Verger et al., 1993).

2.6. Tipificação molecular de *Brucella* sp.

A maioria dos genes pesquisados para a escolha de oligonucleotídeos e sondas para a utilização da técnica de PCR e hibridização tem sido: o gene RNA 16S (Romero et al., 1995; Da Costa et al., 1996), os genes das proteínas da membrana externa BCSP31 (*omp* 31) (Da Costa et al., 1996, Hermam & De Hidder, 1992; Matar et al., 1996), *omp* 25 (25 kDa), *omp* 2 (36-40 kDa) (Cloeckert et al., 1995) e 43kDa (Fekete et al., 1990a e b, 1992a e b), das proteínas do choque térmico DnaJ, DnaK, GroEL e HtrA (Da Costa et al., 1996), a seqüência de inserção (IS)711 (Bricker & Halling, 1994 e 1995), o

gene *bp* que codifica para uma proteína antigênica BP 26 (também conhecida como OMP 28) (Cloekaert et al., 2000) e outros sítios do genoma bacteriano que não foram especificados pelos autores (Bricker & Halling, 1994 e Leal-Klevezas et al., 2000). A amplificação dos genes acima relacionados tem se mostrado específica para o gênero *Brucella* quando testada com a maioria dos microrganismos que causam reações sorológicas cruzadas ou com podem estar presentes nos mesmos materiais biológicos utilizados no diagnóstico de *Brucella* spp. (*Absidia* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Chlamydia psittaci*, *Leptospira* spp., *Listeria* spp., *Mycobacterium* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., etc.) (Romero et al., 1995; Da Costa et al., 1996,).

Alguns destes oligonucleotídeos amplificam, sob algumas condições, bactérias geneticamente muito próximas às *Brucella* spp., como *Ochrobactrum anthropi* (RNA 16S, DnaJ e GroEL) e *Phyllobacterium* spp. (DnaK) (Romero et al., 1995; Da Costa et al., 1996).

A grande similaridade genética entre os membros do gênero *Brucella* havia sido colocada em evidência com os estudos de genoma por hibridização DNA/DNA e DNA/RNA e foi comprovada com os trabalhos de PCR. Entretanto, somente os oligonucleotídeos específicos das seqüências de inserção IS711 mostraram poder fazer uma diferenciação entre algumas das espécies (Hoyer & McCullough, 1968a e b; Verger et al., 1985 e 1987).

A localização genômica da IS6501 (ou IS711) é espécie-específica revelada pelo perfil eletroforético. O número de cópias é moderadamente alto em *Brucella* e varia nas diferentes espécies. Foram determinadas 7-10 cópias em três biovars de *B. melitensis*, 6-8 nos sete biovars de *B. abortus*, assim

como nos quatro biovars de *B. suis* e em *B. canis*, e mais de 28 cópias em *B. ovis* (Ouahrani et al., 1993). A IS6501 (IS711) é observada abaixo da região codificante do gene da proteína BCSP31 de *B. ovis*. (Ouahrani et al., 1993; Halling & Zehr, 1990). Entretanto, essa IS é ausente abaixo do gene BCSP31 em outras espécies de *Brucella* (Ouahrani et al., 1993).

Os genes que codificam para uma das principais proteínas de membrana externa (OMP) de 36-38 kDa foram os primeiros genes OMP identificados (Ficht et al., 1989 e Ficht et al., 1990). Dois genes intimamente relacionados chamados *omp 2a* e *omp 2b*, localizados no locus *omp 2* de *B. abortus* codificam e, potencialmente, expressam a OMP de 36 kDa. A variação genética nesse locus pode ser usada para diferenciar isolados das espécies de *Brucella*. *B. ovis* tem duas cópias do gene *omp 2a*, enquanto as demais espécies apresentam apenas uma cópia. Esses genes são separados por 900 pb e orientados em direções opostas (Ficht et al., 1989 e 1990).

A análise da diversidade das seqüências dos genes *omp 25* entre as espécies de *Brucella* revela que a seqüência de nucleotídeos é altamente conservada entre as espécies desse gênero. A deleção de uma seqüência de 36 pb encontrada no gene *omp 25* de *B. ovis* é única e diferencia essa espécie de todas as outras espécies de *Brucella* (Clockaert et al., 1996).

A técnica de PCR-RFLP com os genes *omp 25* e *omp 2* mostrou, mais facilmente, um polimorfismo intra-gênico em algumas espécies de *Brucella* e mesmo de alguns biovars (Clockaert et al., 1995). O mesmo estudo com os fragmentos obtidos dos genes RNA 16S, *omp 31*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL* e *htrA* não mostrou diferença entre espécies e biovars. Apesar do baixo

número de enzimas utilizadas neste estudo para evidenciar diferenças, estes resultados são previsíveis porque os genes do RNA e das proteínas do choque térmico são muito conservadas inclusive entre os procariotos (Da Costa et al., 1996).

A digestão do genoma das *Brucella* spp. com enzimas de restrição como *Hind* III, *Xba* I e *Xho* I mostrou um certo polimorfismo entre espécies, sendo mais difícil demonstrar diferenças entre os biovars ou as cepas da mesma espécie (Allardet-Servent et al., 1988 e 1990; Bailey & West, 1987; Grayon et al., 1995; Mc Gillivery et al., 1988; Muzny et al., 1989; O'Hara et al. 1985; Zehr & Halling, 1990). O estudo do genoma, após digestão com *Bam*HI e hibridização com sondas de regiões ao acaso do genoma de *Brucella* spp., também mostrou a possibilidade de separar as brucelas em alguns grupos (Grimont et al., 1992).

A utilização de sondas específicas dos genes que codificam as proteínas de membrana externa de 16,5 e 25 kDa (genes *omp 16,5* e *omp 25*) é capaz de identificar algumas espécies de *Brucella* após digestão do DNA pela enzima *Hind*III. A sonda *omp16,5* identifica o biovar 2 de *B. suis* e a sonda *omp25* distingue *B. ovis* e o grupo de *B. melitensis* das outras espécies (Grayon et al., 1995).

O estudo de Verger utilizou, como sondas, genes que codificam para proteínas de membrana externa (*omp 10*, *omp 16* e *omp 19*), proteínas citoplasmáticas (*p 39* e *br 25*) e o gene *39 upga* (localizado abaixo de *p39*) para a hibridização de fragmentos de DNA de *Brucella* clivados com *Hind* III. As sondas *omp 19* e *p 39* deram um único padrão para os 18 isolados de

referência utilizados. A sonda *omp 10* mostrou três padrões de duas bandas diferentes, mas com bandas de tamanho similar e também foi descartada, devido à dificuldade na análise. Com o uso das sondas *br 25*, *39 upga* e *omp 16* foi possível fazer a diferenciação dos isolados de *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* biovar 2. Também foi possível diferenciar estas espécies e biovar das demais espécies e biovars de *Brucella* (Verger et al., 1998).

O polimorfismo no locus *omp 31* foi estudado através de hibridização e PCR-RFLP em isolados de campo e isolados de referência de todas as espécies e biovars de *Brucella*. A amplificação do *omp 31* por PCR a partir do DNA de *B. abortus* não teve sucesso e não foi detectada hibridização entre a sonda de *omp 31* de *B. melitensis* 16M e o DNA total de *B. abortus* digerido com *HindIII*. Análise do PCR-RFLP com *omp 31* em *Brucella* spp. permitiu a identificação de um marcador específico para *B. canis* que faz a diferenciação dessa espécie de outras espécies e biovars de *Brucella*, incluindo *B. suis* biovar 3 e 4. Marcadores específicos para *B. ovis* e *B. suis* biovar 2 também foram encontrados. Outros marcadores foram encontrados por hibridização com plasmídios contendo *omp 31* e DNA adjacente. A combinação dos resultados do PCR-RFLP com os resultados do "Southern blot" permite a diferenciação de todas as espécies de *Brucella*, com exceção de *B. neotomae* que não pode ser diferenciada de *B. suis* biovar 1, 3, 4 e 5. Marcadores biovar-específicos também foram encontrados para *B. melitensis* biovar 1 e *B. suis* biovar 2 (Verger et al., 1997).

O uso de hibridização DNA-DNA com isolados de mamíferos marinhos e isolados de referência pertencentes as seis espécies reconhecidas

de *Brucella* sugere que esses isolados pertencem ao gênero *Brucella*. A hibridização do DNA digerido por *HindIII* com a sonda 16+23S rRNA de *Escherichia coli* revelou um padrão distinto entre os isolados de referência e os isolados de mamíferos marinhos, indicando que essas bactérias podem fazer parte de uma nova espécie dentro do mesmo gênero (Verger et al., 2000).

2.7. Identificação de *Brucella* spp. por PCR

Não existe, até o momento, nenhuma técnica de biologia molecular que, sozinha, seja capaz de diferenciar todas as espécies e biovars de *Brucella* sp. Por esse motivo, essas técnicas não são utilizadas como um procedimento de rotina nos laboratórios para a identificação desses microrganismos.

A técnica de amplificação em cadeia da polimerase tem sido pesquisada para a identificação e detecção das *Brucella* sp. (Baily et al., 1992; Fekete et al., 1990; Fekete et al., 1990 *b*; Fekete et al., 1992 *a*; Fekete et al., 1992 *b*; Hermam & De Ridder, 1992; Bricker & Halling, 1994 e Bricker & Halling, 1995; Romero et al., 1995; Rijpens et al., 1996; Da Costa et al., 1996; Matar et al., 1996; Mercier et al., 1996; Tcherneva et al., 1996; Almonin et al., 1999; Leal-Klevezas et al., 1995; Leal-Klevezas et al., 2000; Ewalt & Bricker, 2000; Amin et al., 2001; Richtznhain et al., 2002). Esta técnica mostrou potencialidade para a detecção de *Brucella* sp. utilizando DNA purificado. Sua utilização para a detecção deste gênero a partir de tecidos e líquidos biológicos com baixo número de bactérias mostra menor sensibilidade, o que está diretamente associada à riqueza em células do hospedeiro no material, à

presença de inibidores da enzima polimerase e à técnica de extração de DNA utilizada (Da Costa et al., 1996).

2.8. Técnica de PCR baseada em seqüência repetitivas (Rep-PCR)

A técnica de PCR, baseada em seqüências repetidas dentro do genoma bacteriano, permite a discriminação de amostras geneticamente relacionadas.

As seqüência repetitivas estão presentes no genoma de todos os organismos. No genoma procarioto, existe uma variedade de seqüências repetitivas utilizadas na escolha de oligonucleotídeos: REP (“repetitive extragenic palindromic sequence”), de 30 – 40 pb; ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”), de 124-127 pb, elemento BOX de 154 pb, a seqüência de inserção (IS)711 (IS6501) de 842 pb e os elementos Bru-RS1 e Bru-RS2 de 103 e 105 pb respectivamente (Versalovic et al., 1991; Martin et al., 1992; Lupski et al., 1992; Halling et al., 1993; Halling et al.,1994; Versalovic et al., 1994).

A função dessas seqüências dentro do genoma dos organismos ainda não está clara. Essas seqüências podem contribuir para a evolução da estrutura cromossômica através de rearranjos no DNA, como duplicações, inversões e deleções. Os genes repetitivos também podem fornecer mecanismo para aumentar a virulência em alguns microrganismos (Lupski & Weinstock, 1992).

A sequência repetitiva BOX é formada por três subunidades denominadas boxA (57 pb), boxB (43 pb) e boxC (50 pb). Essas três subunidades são altamente conservadas no genoma de *Streptococcus pneumoniae* onde o elemento BOX foi inicialmente descoberto. Entretanto, somente a subunidade boxA é altamente conservada no genoma de várias bactérias (Lupski & Weinstock, 1992; Versalovic et al., 1994).

Rep-PCR amplifica as regiões do cromossomo entre as sequências repetitivas. Isolados bacterianos possuem variações quanto às distâncias entre as sequências repetitivas. Dessa forma são produzidos fragmentos de tamanhos distintos, usados na caracterização molecular de microrganismos (Versalovic et al., 1994). BOX-PCR difere de REP e ERIC-PCR por utilizar somente um oligonucleotídeo iniciador, devido à orientação invertida das repetições no genoma (Lupski & Weinstock, 1992; Versalovic et al., 1994).

Os oligonucleotídeos sintetizados a partir de seqüências repetitivas podem caracterizar um gênero, espécie e mesmo cepas diferentes de uma mesma espécie. O estudo de *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *E. coli*, *Bacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. *Streptococcus* sp. e mesmo *Brucella* sp. utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos desenhados a partir de seqüências repetitivas, mostrou um grande potencial na diferenciação desses gêneros, entre espécies e mesmo entre cepas da mesma espécie (Bruijn, 1992; Vinuesa et al., 1998; Zavaglia et al., 2000; Dombek et al., 2000; Jarvis et al., 2000; Kim et al., 2002).

A tipificação do genoma de *E. coli* utilizando REP-PCR e ERIC-PCR obteve os mesmos resultados da tipificação sorológica desta espécie e

pôde mostrar a proximidade de cepas de classificação difícil com cepas de classificação conhecidas, mostrando o potencial desta técnica de facilitar na diferenciação de outras espécies bacterianas (Lipman et al., 1995).

REP e ERIC-PCR foram altamente específicos para isolados de *Rhizobium meliloti*. A árvore filogenética baseada nos perfis eletroforéticos de REP e ERIC-PCR concordaram com a árvore filogenética publicada anteriormente baseada em variações alélicas no locus da enzima 14 dos isolados (Bruijn et al., 1992).

A técnica de REP e BOX-PCR foi utilizada na diferenciação de isolados de *E. coli* quanto a origem, animal ou humana, de contaminação fecal do ambiente. O uso do oligonucleotídeo iniciador BOX A1R gerou melhores perfis eletroforéticos para o agrupamento dos isolados de acordo com sua origem (Dombek et al., 2000). BOX-PCR foi considerado mais eficiente, quando comparado à outras técnicas de biologia molecular, na análise da diversidade genética de *Streptococcus bovis* de cepas de laboratório e isolados de bovinos (Jarvis et al., 2000).

A proximidade genética de *Bacillus anthracis* e espécies intimamente relacionadas foi avaliada por análise de fragmentos gerados por BOX-PCR. A técnica foi considerada altamente discriminatória para determinar a proximidade genética e a diversidade entre os isolados (Kim et al., 2002).

BOX-PCR foi aplicado com sucesso na caracterização de isolados de *Bifidobacterium* sp. provenientes de fezes de crianças. Apesar de 70% dos fragmentos coincidirem quanto ao tamanho e peso molecular, foi possível fazer

o reconhecimento de bandas específicas para cada espécie (Zavaglia et al., 2000).

A caracterização genotípica de isolados de *Bradyrhizobium* nodulantes de legumes foi realizada por várias técnicas moleculares, entre elas BOX, REP e ERIC-PCR. A técnica de PCR utilizada revela uma riqueza de padrões de bandas que apresenta maior poder discriminatório que a sorotipagem. O grau de discriminação pode ser aumentado quando os perfis gerados pelos três diferentes oligonucleotídeos são analisados em associação (Vinuesa et al., 1998).

O uso de oligonucleotídeos REP em *Brucella* spp. revelou padrões distintos de fragmentos amplificados, os quais permitiram a discriminação dessas bactérias em nível de gênero e espécie. ERIC não foi tão discriminativo nesse estudo, mas permitiu a diferenciação do gênero *Brucella* de outros gêneros geneticamente relacionados, como *Agrobacterium* spp. e *Ochrobactrum* spp. (Tcherneva et al., 1996). Mercier et al (1996), utilizando os mesmos oligonucleotídeos, mas com diferentes condições de amplificação, obteve resultados diferentes. Nesse estudo, ERIC-PCR foi mais discriminatório que REP-PCR. A combinação das duas técnicas permitiu a diferenciação das espécies e biovars de *Brucella*, com exceção de *B. abortus* biovars 3 e 9.

Os resultados obtidos pelos dois autores expressam a dificuldade nos estudos que utilizam esta técnica. Pequenas variações nas condições de amplificação podem gerar modificações significativas nos resultados obtidos. Por isso, os resultados só podem ser considerados confiáveis quando as condições de amplificação podem ser fielmente reproduzidas. Cabe salientar

a dificuldade na padronização desta técnica, devido ao grande número de variáveis envolvidas. Encontrar as condições ideais de amplificação tem relação direta com o sucesso da aplicabilidade do método, ou seja, obter máximo poder discriminatório entre os microrganismos em estudo.

A técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos selecionados a partir de seqüências repetitivas mostrou elevado poder discriminatório entre espécies e cepas de bactérias. O elevado grau de discriminação fornecido por rep-PCR, quando aplicado a isolados de gêneros bacterianos como *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, geneticamente próximos ao gênero *Brucella*, é um forte indicativo do sucesso da técnica de BOX-PCR na tipificação molecular de isolados de *Brucella*.

A seqüência IS711 é encontrada somente no genoma de *Brucella* sp., variando no número de cópias e localização genômica entre as espécies (Ouahrani et al., 1993; Halling et al., 1993). O uso de oligonucleotídeos dessa seqüência combinado com outros oligonucleotídeos específicos desse gênero mostrou padrões distintos entre algumas espécies e biovares (Bricker et al., 1994).

Também foram encontrados os elementos Bru-RS1 e Bru-RS2 no genoma das brucelas. Esses elementos são altamente conservados em *Brucella* sp. e aparecem em mais de 35 cópias no genoma dessas bactérias (Halling et al., 1994).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de execução do trabalho

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Medidas de segurança no laboratório durante a manipulação das brucelas vivas

Para a proteção pessoal foram utilizados os seguintes equipamentos de proteção individual: óculos, máscara facial, guarda-pó e luvas de látex.

Durante a manipulação dos microrganismos, o laboratório foi mantido fechado. Foram colocados avisos nas portas indicando a proibição da entrada de pessoas no laboratório durante os procedimentos e alguns minutos após. Teve-se o cuidado de manter o ar condicionado desligado para evitar a circulação de ar, e, conseqüentemente, a dispersão de bactérias no local.

Para os repiques dos microrganismos foram utilizadas agulhas e alças de vidro previamente esterilizadas em forno, em substituição às agulhas e alças de platina convencionais. Esse material, após o uso, foi dispensado em frascos com água clorada para posterior autoclavagem. Esse procedimento evita a flambagem, evitando a formação de aerossóis.

Nos procedimentos onde foi necessária a centrifugação, os microrganismos foram previamente inativados, como descrito no ítem 3.4.

Após a manipulação dos microrganismos, a bancada foi desinfetada com álcool iodado e deixada sob luz ultravioleta (UV) por 20 minutos. O laboratório permaneceu fechado durante esse período.

Todo material contaminado descartado foi rapidamente autoclavado para evitar a infestação por larvas de moscas e o trânsito de formigas.

Luvas de látex e máscaras utilizadas foram autoclavadas antes de serem colocadas no lixo.

3.3. Isolados utilizados

Foram utilizados 51 isolados bacterianos: 38 linhagens de *Brucella* sp. (Tabela 2) e 15 isoladas no Rio Grande do Sul (Tabela 3); 13 bactérias encontradas nos mesmos órgãos e tecidos que as brucelas ou com proximidade genética (Tabela 4).

Todas as amostras são conservadas congeladas em caldo infusão cérebro e coração (BHI) com 15% de glicerol à -20°C , sendo que a maioria também está liofilizada.

Os principais microrganismos que provocam reações cruzadas com *Brucella* sp., ou que são geneticamente próximos, bem como aqueles que podem estar presentes no mesmo material biológico utilizado para o isolamento de *Brucella* sp., foram utilizados como controle de especificidade das reações de PCR.

Tabela 2. Linhagens de *Brucella* utilizados nos experimentos.

Espécie e biovar	N ^o no laboratório	Identificação	Fonte
<i>B. abortus</i> 1	3	B19	¹ CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	4	544	CPVDF
<i>B. abortus</i> 2	15	86/8/59	² AFSSA
<i>B. abortus</i> 3	16	Tulya	AFSSA
<i>B. abortus</i> 4	17	292	AFSSA
<i>B. abortus</i> 5	18	B3196	AFSSA
<i>B. abortus</i> 6	19	870	AFSSA
<i>B. abortus</i> 9	20	C68	AFSSA
<i>B. canis</i>	21	RM6/66	AFSSA
<i>B. melitensis</i> 1	11	16M	CPVDF
<i>B. melitensis</i> 1	22	Rev 1	AFSSA
<i>B. melitensis</i> 1	23	53H38	CPVDF
<i>B. melitensis</i> 2	24	63/9	AFSSA
<i>B. melitensis</i> 3	25	Ether	AFSSA
<i>B. neotomae</i>	26	5K33	AFSSA
<i>B. ovis</i>	10	REO198	CPVDF
<i>B. ovis</i>	27	63/290	AFSSA
<i>B. suis</i> 1	12	1330	CPVDF
<i>B. suis</i> 1	13	SEA	CPVDF
<i>B. suis</i> 2	28	Thomsen	AFSSA
<i>B. suis</i> 3	29	686	AFSSA
<i>B. suis</i> 4	30	40	AFSSA
<i>B. suis</i> 5	31	513	AFSSA

¹Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; ²Agence Française de Santé et Sécurité Alimentaires.

Tabela 3. Isolados de campo de *Brucella* utilizados nos experimentos.

Espécie e biovar	N ^o no laboratório	Identificação	Fonte
<i>B. abortus</i> 1	1	56	¹ CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	2	96	CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	5	1119-3	CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	6	577	CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	7	477	CPVDF
<i>B. abortus</i> 1	8	3875	CPVDF
<i>B. canis</i>	9		CPVDF
<i>B. canis</i>	41		² LBFaVet
<i>B. canis</i>	52	Paraná 09/98	
<i>Brucella</i> sp	49	13A/02	³ LPFaVet
<i>Brucella</i> sp	50	13B/02	LPFaVet
<i>Brucella</i> sp	51	14/02	LPFaVet
<i>Brucella</i> sp	53	16/02	LPFaVet
<i>Brucella</i> sp	54	17A/02	LPFaVet
<i>Brucella</i> sp	55	17B/02	LPFaVet

¹Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; ²Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Laboratório de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.4. Cultivo e confirmação bioquímica do gênero *Brucella*

A confirmação do gênero das brucelas utilizadas, previamente identificadas, teve início a partir de repiques de alíquotas do estoque de microrganismos em placas de ágar BHI (suplementado com 5% de soro equino para *B. abortus* biovar 1 e *B. ovis*) pela técnica de esgotamento. As placas foram incubadas de 3 a 7 dias a 37^oC em microaerofilia (exceto para *B. canis*). A partir de uma colônia de cada amostra, foi feito um novo repique em ágar BHI em tubo para a utilização na coloração de Gram e testes bioquímicos.

Tabela 4. Isolados de outros gêneros utilizados nos ensaios de especificidade.

Espécie	N ^o laboratório	Identificação	Origem	Fonte
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48	⁵ ATCC	⁶ ref	¹ FIOCRUZ
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	43	SEMIA 249	ref	² FEPAGRO
<i>Escherichia coli</i>	36	ATCC 11105	ref	³ LBHCPA
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	32	3301	ref	⁴ AFSSA
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	33	3332	ref	AFSSA
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	34	1(t1)t	ref	AFSSA
<i>Phyllobacterium rubiacearum</i>	35	2(t2)t	ref	AFSSA
<i>Proteus mirabilis</i>	39	ATCC 15290	ref	LBHCPA
<i>Salmonella thyphimurium</i>	37	ATCC 14028	ref	LBHCPA
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	42	SEMIA 5052	ref	FEPAGRO
<i>Rhizobium loti</i>	44	SEMIA 807	ref	FEPAGRO
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	46	9417053	⁷ cam	AFSSA
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	47		cam	AFSSA

¹Fundação Osvaldo Cruz; ²Fundação de Pesquisas Agronômicas; ³Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ⁴Agence Française de Santé et Sécurité Alimentaires; ⁵American Type Culture Collection; ⁶Referência; ⁷Campo.

Para a confirmação das bactérias do gênero *Brucella* foram utilizados os seguintes testes: catalase, oxidase, urease, utilização de citrato, redução de nitrato, motilidade, produção de indol, gelatinase, crescimento em MacConkey, crescimento em fucsina básica (1:50.000 e 1:100.000) e crescimento em tionina (1:50.000 e 1:100.000). Todos os testes bioquímicos, com exceção da catalase, oxidase e urease foram incubados por 48 horas em microaerofilia (exceto para *B. canis*) e foram realizados uma única vez. A classificação foi baseada em Alton et al., 1988, Holt et al., 1994 e McFaddin, 2000.

3.5. Extração de DNA

Para a obtenção do DNA total dos isolados de campo e das linhagens, foi utilizada a técnica baseada na destruição da parede bacteriana com lisozima, SDS (dodecil sulfato de sódio) e proteinase K (Sambrook et al., 1989) com modificações nas concentrações das enzimas e purificação do DNA com fenol e clorofórmio (Da Costa et al., 1996).

As amostras de *Brucella* foram cultivadas em placas de ágar BHI (com adição de 5% de soro eqüino para *B. abortus* biovar 1 e *B. ovis*) a 37°C em microaerofilia (exceto para *B. canis*) por um período de 3 a 7 dias. *Agrobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Phyllobacterium* sp. foram cultivadas em placas de ágar BHI a 30°C por 48 horas. *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. também foram inoculadas em placas de ágar BHI a 37°C por 24 horas. As amostras de *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. foram cultivadas em meio contendo extrato de levedura, triptona CaCl₂.H₂O e água (Apêndice 8.1.1). Após o período de incubação, uma parte do crescimento bacteriano foi transferido do meio sólido para um microtubo tipo “ependorf” contendo 395µl de tampão TE1 (Tris-EDTA) 1X (Apêndice 8.2.1) e congeladas por 24 horas. As amostras de *Brucella* foram previamente inativadas em banho de água a 90°C por 1 hora neste tampão. Após o congelamento, foram adicionados lisozima (Sigma)(concentração final: 1,1mg/mL) e RNase (Gibco-BRL) (CF: 0,7mg/mL) e incubadas a 37°C por 1 hora e a 60°C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados uma solução 20% de SDS (Synth) (CF:3,9%) (Apêndice 8.2.4) e proteinase K (Gibco-BRL) (CF: 0,7mg/mL) e incubadas a

56⁰C por 15 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado igual volume de fenol tamponado (Apêndice 8.2.5), feita mistura por inversões repetidas e uma centrifugação por 10 minutos a 15.495g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi repetida a extração com fenol. Após esta etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado igual volume de clorofórmio, misturado e centrifugado por 10 minutos a 15.495g. Esta etapa foi repetida uma vez. O DNA extraído foi precipitado com 1/50 (v/v) de NaCl 5M (Apêndice 8.2.3) e 1mL de etanol absoluto frio, recolhido por centrifugação por 20 minutos a 15.493 g, lavado com etanol 70%, ressuspendido em TE2 (Apêndice 8.2.2). A estocagem do DNA dos microrganismos foi feita em TE2 em tubos tipo “eppendorf” a -20⁰C para posterior manipulação.

Foram feitas pelo menos três extrações de cada amostra.

3.6. Análises quantitativas e qualitativas do DNA

A concentração do DNA extraído dos isolados foi avaliada através de comparações entre as amostras e diluições conhecidas do DNA do fago lambda (λ) (Pharmacia), segundo Sambrook et al. (1989). Foi utilizado o DNA de lambda nas concentrações de 500ng/ μ L, 252ng/ μ L, 125ng/ μ L e 62,5ng/ μ L. Um microlitro de DNA de cada isolado foi colocado sobre um gel de agarose 0,8% preparado com água destilada e brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) (Apêndice 8.3.2). Um microlitro de cada uma das diluições de lambda foi colocado sobre o mesmo gel e visualizados em um transluminador, sob luz ultravioleta. A concentração de DNA foi determinada por comparação de intensidade de

fluorescência emitida pelo DNA dos isolados em relação a fluorescência apresentada pelo DNA de lambda nas diferentes concentrações.

Para avaliar a pureza das amostras de DNA, foi realizada eletroforese a 75 V por uma hora em gel de agarose 0,8% preparado com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x (Apêndice 8.3.3) contendo brometo de etídeo (0,5µg/mL) (Apêndice 8.3.2), com 7µl do DNA extraído de cada amostra.

3.7. Confirmação do gênero *Brucella* por PCR

Os isolados do gênero *Brucella* foram submetidos a análise pela técnica de PCR com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para este gênero, baseados na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica uma proteína de 31kDa (BCSP31). As seqüências dos oligonucleotídeos, as concentrações dos reagentes e as condições de amplificação foram as descritas por Da Costa e colegas (1996). Para este ensaio, foram utilizados DNA molde na concentração final de 10ng na reação em um aparelho termociclador Eppendorf (Mastercycler® personal).

3.8. Tipificação molecular de *Brucella* spp. através de BOX-PCR

3.8.1. Oligonucleotídeo iniciador

Foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador BOXA 1R descrito por Versalovic et al. (1994) (5`TCAGGCAAGGCGACGCTGACG-3`).

3.8.2. Padronização das condições de amplificação

Para a padronização das condições de amplificação de BOX-PCR foram testados dois protocolos diferentes (Versalovic et al., 1994 e Alippi & Aguilar, 1998). A partir destes dois protocolos foram testadas modificações nas concentrações dos reagentes e condições de amplificação, a fim de determinar as condições ideais para a realização da técnica.

3.8.2.1. Testes realizados a partir do protocolo de Versalovic et al. (1994)

Foram preparados em laboratório três tampões de reação 5 vezes concentrados (5X), a partir do tampão de reação concentrado 5X descrito, com algumas modificações nos reagentes utilizados. O tampão de reação 5X descrito por Versalovic et al. (1994) contém 83mM de acetato de amônio, 335mM de Tris-HCl, 33,5mM de MgCl₂, 33,5μM de EDTA, 150mM de β-mercaptoetanol, 850μg/mL de albumina soro bovina e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). O primeiro tampão de reação 5X preparado em laboratório teve a concentração de β-mercaptoetanol modificada de 150mM para 34,95mM. Neste tampão de reação não houve a adição DMSO como no tampão de reação descrito. O segundo tampão de reação 5X foi preparado com a mesma concentração de β-mercaptoetanol (34,95 mM) utilizada no primeiro tampão de reação 5X, porém teve a adição de 10% de DMSO (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de MgCl₂, β-mercaptoetanol e DMSO dos tampões preparados em laboratório e do tampão descrito por Versalovic et al. (1994).

	MgCl ₂	β-mercaptoetanol	DMSO
Tampão descrito	33,5mM	150mM	10%
Primeiro tampão	33,5mM	34,95 mM	-
Segundo tampão	33,5mM	34,95 mM	10%
Terceiro tampão	-	34,95 mM	10%

(-) ausência do reagente.

Para testar diferentes concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂), foi preparado um terceiro tampão de reação 5X com as mesmas concentrações de β-mercaptoetanol (34,95mM) e DMSO (10%) utilizadas nos dois tampões descritos acima, mas sem adição de MgCl₂ (Tabela 5). O cloreto de magnésio utilizado também foi preparado no laboratório e foi adicionado separadamente às reações de PCR realizadas com o terceiro tampão de reação 5x. As concentrações finais (CF) de cloreto de magnésio testadas para cada reação de 25μL foram: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5mM.

Para todos ensaios foi utilizada *Taq* DNA polimerase de dois fabricantes (Biotools e Cenbiot).

Modificações nas condições de amplificação também foram testadas a partir do protocolo de um ciclo de desnaturação inicial 95⁰C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 90⁰C por 30 segundos, anelamento a 52⁰C por 1 minuto e extensão a 65⁰C por 8 minutos e uma extensão final a 65⁰C por 16

minutos. A partir da temperatura de anelamento descrita de 52⁰C, foi feita a redução em 1⁰C para cada novo teste até a temperatura de 48⁰C. Além do tempo de anelamento descrito de 1 minuto, também foi testado o tempo de 1,5 e 2 minutos.

Os três tampões de reação preparados em laboratório foram utilizados para cada modificação realizada nas condições de amplificação.

3.8.2.2. Testes realizados a partir do protocolo de Alippi & Aguilar (1998).

Nestes ensaios, foram utilizados os mesmos tampões de reação, MgCl₂ e *Taq* DNA polimerase descritos acima.

Também foram testadas as concentrações finais do oligonucleotídeo iniciador de 0,5 e 1 μM. As mesmas concentrações de MgCl₂ testadas para o protocolo de Versalovic et al. (1994) também foram utilizadas.

Modificações nas condições de amplificação também foram testadas. O protocolo descreve 1 ciclo de desnaturação inicial a 95⁰C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94⁰C por 1 minuto, anelamento a 53⁰C por 1 minuto e extensão a 65⁰C por 8 minutos e uma extensão final a 65⁰C por 15 minutos. Outras temperaturas e tempos de anelamento testadas foram: 52, 51, 50 e 48⁰C para 1,5 e 2 minutos. Foram feitas reduções nos tempos de desnaturação inicial (de 7 para 2 minutos), extensão (de 8 para 5 minutos) e extensão final (de 16 para 15 minutos) com base em modificações feitas no protocolo de Alippi e Aguilar (1998) por Beneduzi (2003).

3.8.2.3. Outras modificações realizadas nos protocolos de Versalovic et al. (1994) e Alippi & Aguilar (1998)

Para os dois protocolos foram testadas as concentrações finais de DNA molde nas reações de 25µL de 4, 10 e 20ng e a adição de soro albumina bovina (BSA) (CF: 0,32 ng). Duas técnicas de extração foram utilizadas para a obtenção do DNA dos isolados (Sambrook et al., 1989; Da Costa et al., 1996). Para todos os testes foi utilizado o DNA proveniente de ambas técnicas. Também foram testadas diferentes marcas de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 5X e MgCl₂ (Gibco-BRL e Invitrogen). DNA extraído e estocado por diferentes períodos de tempo, 24 horas ou alguns dias, e temperaturas de congelamento (-20°C) ou resfriamento (4°C) foram testados.

3.9. Eletroforese em gel de agarose

A análise dos fragmentos do PCR, de aproximadamente 580 pb, amplificados com os oligonucleotídeos específicos para o gênero *Brucella* foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, de 6 cm, a 70 V, por 1,5 horas. Os produtos de BOX-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, de 10,5 cm de comprimento, a 85 V, por 2,5 horas. O preparo dos géis foi feito com TBE 0,5X e brometo de etídeo (0,5µg/mL) para a visualização do DNA em transluminador, sob luz UV.

Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado DNA do fago λ digerido com *Eco*RI e *Hind*III (Gibco-BRL) como marcador de tamanho molecular. A digestão gera 12 fragmentos entre 21230 e

125 pb. Para a análise dos fragmentos obtidos por BOX-PCR foram usados os fragmentos de 3530, 2030, 1900, 1540, 1380, 940, 831 e 560 pb.

3.10. Análise dos resultados

A imagem do gel foi capturada por câmera digital da Kodak (DC 120 Zoom Digital Picture Transfer Application, versão 1.0.2) e analisada pelo programa Kodak 1 D, versão 3.5.2.

Para a análise estatística e construção dos dendrogramas, foi utilizado o programa SPSS 10.1 que considera a presença ou ausência de determinada característica atribuindo valores 1 e 0, respectivamente, para essas características. Os dendrogramas foram construídos com base na presença ou ausência de bandas geradas por BOX-PCR e resultados positivos ou negativos para os testes bioquímicos. A similaridade entre os isolados foi avaliada pelo coeficiente de Dice e os grupamentos foram feitos por UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Averages).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Confirmação bioquímica de *Brucella* sp.

Alguns resultados obtidos com os testes bioquímicos foram comuns a todos os isolados de *Brucella* sp. testados: catalase apresentou resultado positivo; motilidade, gelatina, indol, e citrato apresentaram resultados negativos. Os demais resultados e os isolados submetidos aos testes estão listados nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

Tabela 6. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de *B. abortus*.

	⁵ ₁ - biovar 1-C	⁵ ₂ - biovar 1-C	⁵ ₅ - biovar 1-C	⁵ ₆ - biovar 1-C	⁵ ₇ - biovar 1-C	⁵ ₈ - biovar 1-C	⁵ ₃ - biovar 1-R	⁵ ₄ - biovar 1-R	⁵ ₁₅ - biovar 2-R	⁵ ₁₆ - biovar 3-R	⁵ ₁₇ - biovar 4-R	⁵ ₁₈ - biovar 5-R	⁵ ₁₉ - biovar 6-R	⁵ ₂₀ - biovar 9-R
Oxidase	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
¹ MacConkey	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
² Fu(1:50.000)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
³ Nitrato	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
⁴ Ti(1:100.000)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Ti(1:50.000)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

¹Crescimento em ágar MacConkey; ²Crescimento em fucsina; ³Redução de nitrato; ⁴Crescimento em tionina; ⁵Número do isolado; (R) Isolado de referência; (C) Isolado de campo; (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Tabela 7. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de *B. suis* de referência.

	⁵ 12-biovar 1	⁵ 13-biovar 1	⁵ 28-biovar 2	⁵ 28-biovar 3	⁵ 30-biovar 4
Oxidase	+	+	+	+	+
¹ MacConkey	-	-	+	+	+
² Fu(1:50.000)	-	-	+	-	+
³ Nitrato	-	+	+	-	-
Urease	+	+	+	+	+
⁴ Ti(1:100.000)	+	+	+	+	-
Ti(1:50.000)	+	+	+	-	-

¹Crescimento em ágar MacConkey; ²Crescimento em fucsina; ³Redução de nitrato; ⁴Crescimento em tionina; ⁵Número do isolado; (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Catalase, motilidade, gelatina, indol e citrato apresentam o mesmo resultado para todas as espécies de *Brucella* sp.

A maioria dos resultados dos testes bioquímicos realizados com os isolados de brucela correspondem aos resultados descritos na literatura para o gênero *Brucella* (Alton et al., 1988; Holt et al., 1994 e McFaddin, 2000), como pôde ser demonstrado com os testes de oxidase, redução de nitrato, crescimento em presença de corantes e urease.

No teste de oxidase, exceto *B. neotomae* e *B. ovis*, os quais sempre apresentam resultado negativo, outras espécies, geralmente, apresentam resultado positivo e o teste pode ser usado na identificação do gênero (Alton et al., 1988).

Tabela 8. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de *B. melitensis* de referência.

	⁵ 11-biovar 1	⁵ 22-biovar 1	⁵ 23-biovar 1	⁵ 24-biovar 2	⁵ 25-biovar 3
Oxidase	+	+	+	+	+
¹ MacConkey	+	+	+	+	-
² Fu(1:50.000)	-	+	+	+	+
³ Nitrato	-	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+
⁴ Ti(1:100.000)	+	+	+	+	+
Ti(1:50.000)	+	+	+	+	-

¹Crescimento em ágar MacConkey; ²Crescimento em fucsina; ³Redução de nitrato; ⁴Crescimento em tionina; ⁵Número do isolado; (-) Resultado negativo.

Os resultados obtidos com redução de nitrato, urease, crescimento em fucsina 1:100.000 e crescimento em tionina 1:50.000 e 1:100.000 concordaram com os resultados esperados para cada espécie de brucela. O crescimento em presença de corantes como fucsina básica e tionina pode ser usado na diferenciação de alguns biovars (Alton et al., 1988). Pôde-se observar certa divergência quando os resultados obtidos pelo crescimento em presença de tionina dos isolados testados (1:50.000) foi comparado descritos por Holt et al. (xxxx). Algumas linhagens de *B. abortus* biovars 3 (isolado 16), 4 (isolado 17), 5 (isolado 18) e 9 (isolado 20) e *B. suis* biovars 3 (isolado 28) e 4 (isolado 30) apresentaram resultado negativo, enquanto que o resultado descrito por Holt et al. (xxxx) é positivo. Alton et al., 1988

Certa discordância foi observada em *B. ovis* que não mostrou crescimento em ágar MacConkey e em fucsina 1:50.000 (McFaddin, 2000),

mesmo com um maior tempo de incubação da cultura (3 dias adicionais). Resultados negativos não esperados em alguns ensaios podem estar relacionados ao estresse fisiológico dos microrganismos. O estresse pode estar associado principalmente ao ambiente, uma vez que as condições naturais de crescimento das brucelas não são reproduzidas no laboratório.

Tabela 9. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de *B. canis*.

	9 – <i>B. canis</i> - C	52 - <i>B. canis</i> – C	21 - <i>B. canis</i> - R
Oxidase	+	+	+
¹ MacConkey	-	+	+
² Fu (1:50.000)	+	-	-
³ Nitrato	+	+	+
Urease	+	+	+
⁴ Ti (1:100.000)	+	+	+
⁴ Ti (1:100.000)	-	-	-

¹Crescimento em ágar MacConkey; ²Crescimento em fucsina; ³Redução de nitrato; ⁴Crescimento em tionina; ⁵Número do isolado; (R) Isolado de referência; (C) Isolado de campo; (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

A maioria dos isolados de *Brucella* sp. tem atividade de urease. Alguns isolados de *B. suis* e *B. abortus* podem quebrar a molécula de uréia rapidamente. Culturas de *B. melitensis*, normalmente, são consideradas lentas degradadoras de uréia, mas já foram isoladas culturas com atividade rápida de urease. *B. neotomae* e *B. canis* apresentam resultado positivo para urease e a

maioria das amostras de *B. ovis* apresenta resultado negativo (Alton et al., 1988).

Tabela 10. Resultados dos testes bioquímicos obtidos com os isolados de *B. ovis* e *B. neotomae*.

	⁵ 10 - <i>B. ovis</i> - R	⁵ 27 - <i>B. ovis</i> - R	⁵ 26 - <i>B. neotomae</i> -R
Oxidase	-	-	-
¹ MacConkey	-	-	+
² Fu (50:000)	-	-	-
³ Nitrato	-	+	+
Urease	+	+	+
⁴ Ti (1:100.000)	+	+	+
⁴ Ti (1:50.000)	+	+	-

¹Crescimento em ágar MacConkey; ²Crescimento em fucsina; ³Redução de nitrato; ⁴Crescimento em tionina; ⁵Número do isolado; (R) Isolado de referência; (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Quando comparados os resultados dos testes realizados dos isolados de campo com os isolados de referência, pôde-se notar pouca discordância entre as amostras.

Muitas dificuldades estão associadas à identificação de culturas bacterianas como pertencentes ao gênero *Brucella* e em sua classificação quanto à espécie e biovar.

Alguns testes bioquímicos de rotina, como os realizados no presente trabalho, podem ser realizados em um laboratório moderadamente equipado.

Outros testes, como lise por fagos e metabolismo oxidativo utilizando carboidratos e aminoácidos específicos como substrato, não são facilmente acessíveis devido ao número reduzido de laboratórios autorizados que possuem estes reagentes e equipamentos necessários. Para *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, são necessários quatro testes adicionais para a classificação até biovar: requerimento de CO₂, produção de H₂S, sensibilidade a corantes específicos (tionina e fucsina) e aglutinação com soros específicos. Além da complexidade dos testes, é necessário um longo período de incubação para a obtenção dos resultados (Alton et al., 1988; Bricker, 2002).

Outro aspecto negativo dos métodos convencionais de identificação aplicados à *Brucella* sp. é a natureza zoonótica deste microrganismo. As brucelas são um risco potencial para as pessoas que manipulam o microrganismo vivo, sendo necessário pessoas altamente treinadas para o isolamento e identificação dessa bactéria (Bricker, 2002).

Ocasionalmente, podem ser encontradas culturas que não se enquadram nas tabelas e chaves de identificação. Quando essas culturas atípicas são encontradas é necessário estabelecer se esse é um fenômeno que se repete, representando um padrão de taxonomia local e não um erro de laboratório. Características atípicas podem representar um marcador epidemiológico (Alton et al., 1988). Devido ao pequeno número de diferenças entre as espécies e os biovars, a menor mutação pode resultar em dados conflitantes, dificultando a interpretação (Bricker, 2002).

Outro fator limitante na identificação de *Brucella* sp. é a perda de viabilidade da cultura após alguns repiques, sendo necessária a realização dos

testes o mais rápido possível, após o isolamento da bactéria (Alton et al., 1988).

A análise dos resultados das provas bioquímicas não foi suficiente para separar os isolados de *Brucella* sp., como era esperado, nem mesmo em nível de espécie. Devido a todos os problemas associados à identificação de espécies e biovars de *Brucella* sp., numerosos métodos de caracterização por PCR tem sido estudados.

4.2. Confirmação molecular de *Brucella* sp.

A PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Brucella* spp. (Bruc 887 e Bruc 1457), baseados na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína de 31kDa (BCSP31), gerou o produto de 580 pb para todas as bactérias deste gênero. O mesmo ensaio realizado com os gêneros *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* como controle da especificidade da reação não gerou produtos de amplificação. Os gêneros *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. não haviam sido testados com estes oligonucleotídeos até o momento. Sendo estas bactérias geneticamente próximas ao gênero *Brucella*, estes resultados confirmam, mais uma vez, a especificidade da reação. Alguns resultados selecionados estão apresentados na figura 1.

O fragmento de 580 pb gerado na PCR com os oligonucleotídeos iniciadores Bruc 887 e Bruc 1457 tem tamanho próximo ao fragmento esperado de 594 pb. (Da Costa et al., 1996).

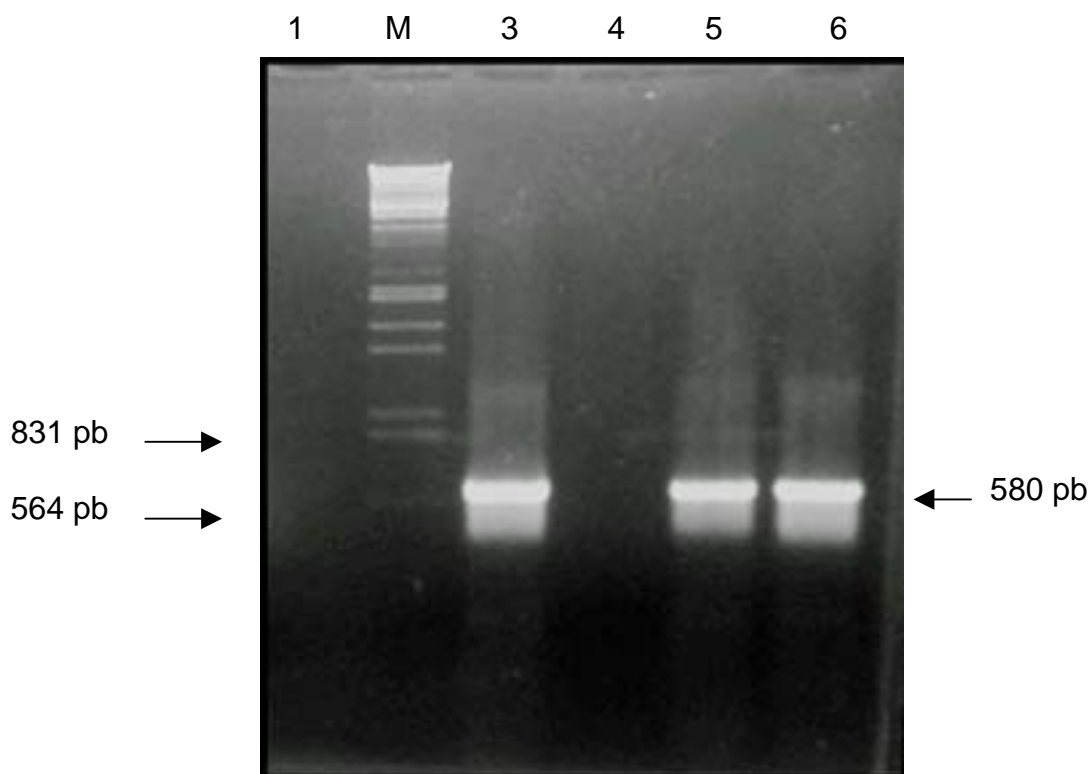


Figura 1: Confirmação do gênero *Brucella* e a especificidade da reação com o par de oligonucleotídeos Bruc 887/1457. Canaletas: 1, controle negativo; (M) Marcador molecular DNA λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*; 3, *B. abortus* biovar 4 (isolado 17); 4, *Ochrobactrum* sp. (isolado 33); 5 *B. melitensis* biovar 1 (isolado 22); 6, *B. suis* biovar 2 (isolado 28);

A ausência de bandas para as bactérias dos gêneros geneticamente relacionados (*Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*) e encontrados nos mesmos órgãos e tecidos que as bactérias do gênero *Brucella* (*Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Yersinia*) confirma que, nas condições de amplificação utilizadas, estes microrganismos não causam dificuldades na identificação deste gênero.

A PCR com os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos para *Brucella* sp. pode ser utilizado como um método para a detecção das bactérias

desse gênero, quando não há necessidade de um conhecimento prévio de espécie e biovar. Essa técnica tem vantagens sobre as provas bioquímicas para a caracterização do gênero, sendo considerada robusta, específica, rápida e segura (após a inativação dos isolados) (Da Costa et al., 1996).

4.3. BOX-PCR

4.3.1. Protocolo de BOX-PCR utilizado

As reações foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo tampão de reação 1x (Invitrogen), 0.5mM de deoxinucleotídeos (Amersham Biosciences), 1µM do oligonucleotídeo iniciador BOXA 1R, 3,5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1U de Taq polimerase (Invitrogen), 0,32ng de BSA (Amersham Biosciences) e 10ng de DNA molde. Três aparelhos termociclador: PCR Sprint Temperature Cycling System (Thermo Hybaid), Eppendorf (Mastercycler® personal) e Progene (Techne) foram utilizados para a amplificação com as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo inicial de 2 min a 94⁰C; 30 ciclos de 1 min a 94⁰C, 1 min e 30 s a 50⁰C e 5 min a 65⁰C; e 1 ciclo de 15 min a 65⁰C.

Para assegurar os resultados obtidos, foram utilizados controles em cada reação de amplificação: um controle positivo, que consistiu de uma reação contendo DNA de *Rhizobium* sp. e um controle negativo, sem a presença do DNA molde. Cada amostra foi submetida a PCR pelo menos duas vezes.

4.3.2. Padronização da reação

Muitos testes foram realizados até a obtenção de fragmentos por BOX-PCR com os isolados testados, pois esta técnica é considerada sensível a mínimas alterações nas condições de amplificação e possíveis inibidores.

O problema de inibição nas reações de PCR é pouco discutido. A inibição pode ser parcial, reduzindo a sensibilidade de detecção, ou, em alguns casos, total, sendo um dos problemas mais comuns de falso-negativo. A inibição pode ser causada por falhas nas condições de amplificação, como a falta de uniformidade da temperatura no termociclador, reagentes de baixa qualidade e em concentrações não adequadas e temperaturas e tempos de amplificação não padronizados (Wilson, 1997).

Alguns desses problemas podem ser resolvidos pela adição de DMSO ou $MgCl_2$ à reação. Com a adição de diferentes concentrações $MgCl_2$ às reações, foi possível determinar a concentração ideal desse reagente na obtenção de perfis de bandas mais complexos. Cloreto de magnésio em alta concentração permitiu a amplificação de um número maior de fragmentos, porém com perda de resolução e aumento de rastro. Esses resultados também foram obtidos por Snelling et al. (1996) na tipificação de isolados do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* por REP-PCR.

O uso de marcas diferentes de *Taq* polimerase foi de grande importância na tentativa de obter-se fragmentos amplificados por BOX-PCR. Apenas as reações realizadas com a *Taq* polimerase da marca Invitrogen produziram fragmentos por BOX-PCR. As enzimas diferem na processividade e

fidelidade de acordo com o fabricante. Além disso, algumas enzimas são mais suscetíveis a certos inibidores que outras (Wilson, 1997). Variações na marca da DNA polimerase e natureza do tampão causam mudanças no padrão de bandas, por alteração da especificidade de BOX-PCR (Van Belkum et al., 1996). Os mesmos autores combinando *Taq* polimerase com seu tampão apropriado, obtiveram amplificação de fragmentos por BOX-PCR em isolados de *Streptococcus* sp. que não geravam fragmentos com outras marcas de enzima e tampão.

DNA insuficientemente purificado também pode afetar o sucesso da amplificação. O mecanismo de ação desses inibidores ainda não é suficientemente compreendido. Sabe-se que eles interferem na disponibilidade ou atividade de componentes essenciais na reação. Compostos fenólicos podem impedir a ligação da *Taq* polimerase ao DNA ou degradar a enzima (Wilson, 1997). O uso de dois protocolos de extração de DNA foi fundamental na obtenção de fragmentos por BOX-PCR. A amplificação de fragmentos foi possível somente com DNA obtido pela técnica de extração que utiliza duas etapas com fenol e duas etapas com clorofórmio (Da Costa et al., 1996). Utilizando o protocolo de extração de DNA descrito por Sambrook et al. (1989), não houve amplificação. Neste protocolo são utilizadas duas etapas adicionais com fenol e clorofórmio/álcool isoamílico (1/1). Isso sugere a inibição da reação por algum resíduo deixado no DNA obtido pelo protocolo de Sambrook et al. (1989). O uso de DNA de *Acinetobacter* sp. extraído com diferentes técnicas (fervura e fenol/clorofórmio) em REP-PCR gerou perfis eletroforéticos diferentes para os isolados testados. Neste caso, presença de rastro ou

ausência de produto de amplificação podem estar associados a nucleases liberadas durante a fervura das células ou a presença de inibidores da reação (Snelling et al., 1996). A inativação das células antes da extração de DNA dos isolados de *Brucella* sp. pode ser responsável por diferenças nos extratos de DNA (Da Costa et al., 1996).

Insucesso na amplificação por BOX-PCR foi evidenciado com a utilização de DNA de *Paenibacillus* sp. estocado por um certo período de tempo (Alippi e Aguilar, 1998). O uso de DNA de *Brucella* sp. com diferentes períodos de estocagem não alterou os resultados obtidos. Não foram observadas diferenças no uso de DNA estocado por congelamento (-20°C) ou somente resfriado (4°C).

A adição de BSA às reações aumentou a complexidade dos perfis de bandas gerados. As reações sem a adição da proteína revelaram um número menor de fragmentos amplificados com menor intensidade. A amplificação é facilitada quando é adicionado um componente à reação com grande afinidade pelo inibidor, diminuindo a chance de complexação do inibidor com algum componente essencial para a reação de PCR (Wilson et al, 1997).

Alterações nas temperaturas e tempos dos ciclos foram necessárias para a obtenção um melhor perfil de bandas em relação ao número e intensidade dos fragmentos. A temperatura de 50°C produziu perfis mais complexos. Esse perfil não foi alterado quando a temperatura foi reduzida para 48°C. Já a temperatura de 52°C não favoreceu a amplificação de alguns fragmentos, pois o maior número de fragmentos obtido com essa temperatura foi dois. A diminuição na temperatura e do tempo de desnaturação inicial, a

diminuição no tempo de extensão e o aumento no tempo de anelamento foram realizadas com base no protocolo de Alippi & Aguilar (1998) modificado e padronizado por Beneduzi (2003). O maior tempo de anelamento permite que a fita molde de DNA sofra uma maior exposição ao oligonucleotídeo iniciador. A temperatura de desnaturação inicial foi reduzida, porque o uso de um longo tempo de desnaturação inicial é necessário quando células de cultura são adicionadas diretamente à reação (Beneduzi, 2003). Longos tempos de extensão podem facilitar o aparecimento de fragmentos de alto tamanho molecular (Versalovic et al., 1998). Produtos de amplificação de alto tamanho molecular podem ser artefatos da PCR e estão perto do limite de extensão da *Taq* DNA polimerase, não sendo reprodutíveis (Snelling et al., 1996).

Muitas dificuldades foram encontradas na padronização de BOX-PCR. Porém, resultados satisfatórios não foram obtidos quando os ensaios foram repetidos.

Apesar das condições de amplificação serem mantidas, os padrões de fragmentos não foram os mesmos para todas as reações realizadas para cada amostra testada. Frequentemente, um número reduzido de bandas ou a ausência de fragmentos foram observados. Rastros visualizados nos géis após a eletroforese das reações também foram observados. Todas amostras de DNA foram submetidas previamente a eletroforese para a detecção de possíveis danos durante o procedimento de extração. Essas variações podem indicar que a degradação do DNA ocorreu durante a reação de PCR, pois quando adicionado à mistura de PCR ainda apresentavam boas condições de integridade.

Outro ponto importante a ser considerado é o grande número de amostras submetidas ao BOX-PCR sem qualquer amplificação. De 51 isolados testados, não foram observadas bandas em 16 isolados de *Brucella* sp.: *B. abortus* 2 (isolado 15), *B. canis* (isolados 21 e 41), *B. melitensis* 1 (isolado 22), *B. neotomae* (isolado 26), *B. ovis* (isolados 10 e 27), *B. suis* biovar 1 (isolado 13), *B. suis* biovar 5 (isolado 31), *Brucella* sp. (isolados 49, 50, 51, 53, 54 e 55); e 3 isolados de outros gêneros: *Ochrobactrum* sp. (isolado 32), *Proteus* sp. (isolado 39), *Rhizobium* sp. (isolado 44), *Yersinia* sp. (isolado 47). Esse número representa uma parcela significativa do total de isolados submetidos à técnica.

Os problemas de inibição de amplificação em BOX-PCR não ocorreram na PCR com os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos, uma vez que a técnica foi considerada reprodutível. Provavelmente há algum contaminante de natureza e ação desconhecida nos reagentes utilizados ou nas amostras de DNA. Provavelmente o BOX-PCR é mais sensível às variações nas condições de amplificação, acaba sendo afetado, enquanto que a PCR gênero-específica é realizada com sucesso.

4.4. Fragmentos obtidos por BOX-PCR

A técnica de BOX-PCR gerou 68 fragmentos para os isolados dos gêneros bacterianos deste estudo. Os tamanhos dos fragmentos variam de 3483 a 218 pb.

Nem todos os isolados bacterianos submetidos ao teste geraram fragmentos. Entre os isolados de brucela, 23 isolados geraram produtos de

amplificação por BOX-PCR: *B. abortus* biovar 1 (isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9), *B. abortus* biovar 3 (isolado 16), *B. abortus* biovar 4 (isolado 17), *B. abortus* biovar 5 (isolado 18), *B. abortus* biovar 6 (isolado 19), *B. abortus* biovar 9 (isolado 20), *B. canis* (isolados 9 e 52), *B. melitensis* 1 (isolados 11 e 23), *B. melitensis* 2 (isolado 24), *B. melitensis* 3 (isolado 25), *B. suis* biovar 1 (isolado 12), *B. suis* biovar 2 (isolado 28), *B. suis* biovar 3 (isolado 29), *B. suis* biovar 4 (isolado 30). e entre os demais gêneros *Ochrobactrum* (isolado 33), *Phyllobacterium* (isolados 34 e 35), *Escherichia* (isolado 36), *Salmonella* (isolado 37), *Rhizobium* (isolado 42), *Bradyrhizobium* (isolado 43), *Yersinia* (isolado 47) e *Agrobacterium* (isolado 48) mostraram produtos de amplificação.

Os isolados de *Brucella* sp. produziram 22 (entre 11-18 por isolado) fragmentos com tamanhos variando de 218 a 3494 pb (figura 2). Segundo Versalovic et al. (1994), a quantidade ideal de bandas por isolado para uma análise comparativa rigorosa deve estar entre 8-16.

Observou-se 8 fragmentos comuns entre as espécies e biovars: 306, 409, 672, 796, 846, 925, 979 e 1373 pb. Esses fragmentos, em conjunto, podem ser utilizados na caracterização do gênero.

Analisando os perfis eletroforéticos dos isolados de *Brucella* sp., não foi possível encontrar bandas características de determinada espécie, capaz de diferenciar uma espécie das demais. Os isolados diferiram entre si pela presença ou ausência de uma única banda, dentro da mesma espécie. A diferenciação também pode ser feita pela combinação de fragmentos presentes e ausentes entre os isolados.

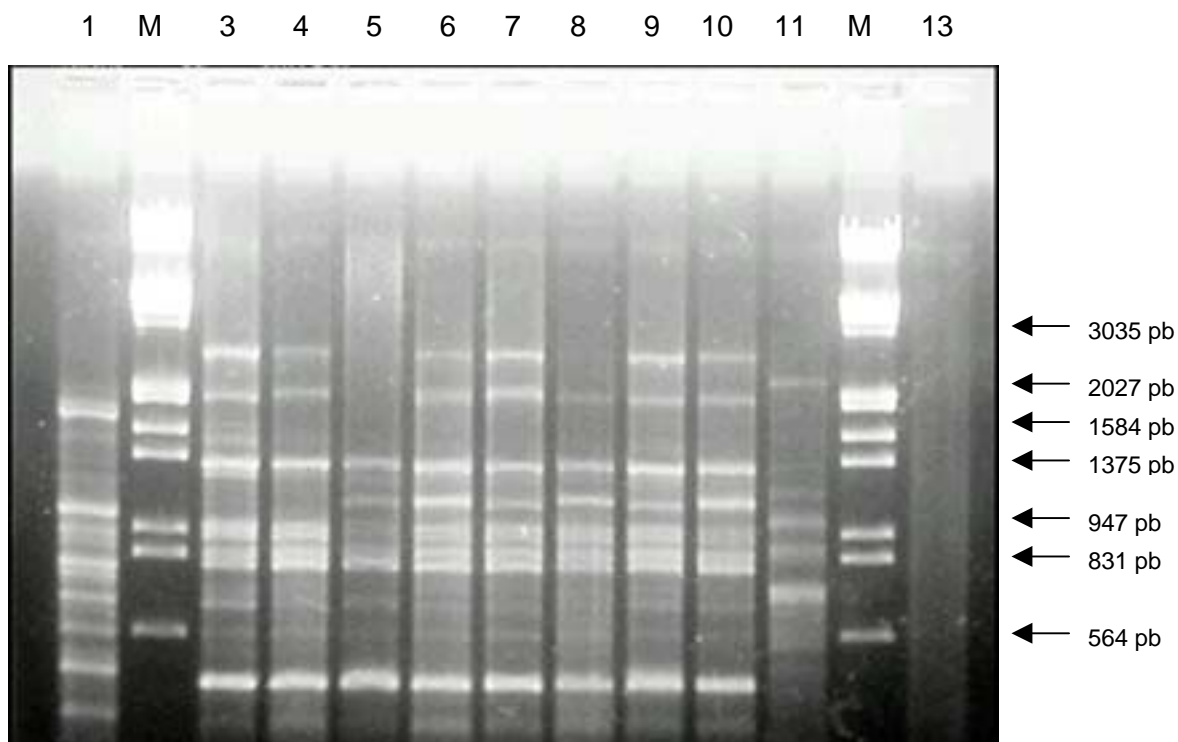


Figura 2. Perfis de BOX-PCR. Canaletas: 1, controle positivo *Rhizobium* sp. (isolado 42); 3, *B. abortus* biovar 1 (isolado 1); 4, *B. abortus* biovar 1 (isolado 2); 5, *B. melitensis* biovar 1 (isolado 11); 6, *B. canis* (isolado 9); 7, *B. suis* biovar 1 (isolado 12); 8, *B. abortus* biovar 5 (isolado 18); 9, *B. melitensis* biovar 1 (isolado 23); 10, *B. melitensis* biovar 3 (isolado 25); 11, *Bradyrhizobium* sp.; 13, controle negativo; (M) Marcador molecular DNA λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*;

Algumas bandas estavam presentes na maioria dos isolados de *Brucella* sp. testados. Os fragmentos de 2860 e 1954 pb não aparecem somente em *B. melitensis* biovar 1 (isolado 11), mas apareceu no isolado 23, de mesmo biovar (Figura 2). O fragmento de 487 pb não aparece em *B. suis* biovar 1 (isolado 16).

O fragmento de 3484 pb estava presente somente em *B. abortus* biovar 6 (isolado 19) e o fragmento de 631 pb foi amplificado somente em *B.*

abortus biovar 4 (isolado 17). *B. abortus* biovar 4 (isolado 17) e *B. abortus* biovar 9 (isolado 20) apresentaram os fragmentos de 1218 e 1143 pb. O fragmento de 1143 também foi amplificado em *B. abortus* biovar 1 (isolado 2) (Figura 2).

A banda de 218 pb foi observada na maioria dos isolados de *B. abortus* biovar 1, estando ausente nas demais espécies e biovars (Tabela 11).

B. canis mostrou certa divergência em relação a presença e ausência de algumas bandas, como indicado na tabela 12. Essas divergências podem estar atribuídas à origem dessas bactérias, que são amostras de campo isoladas em locais diferentes. Para assegurar esses resultados é necessário o teste com um número maior de amostras. Esses isolados não apresentam tanta discordância em relação aos testes bioquímicos, diferindo no resultado de apenas dois testes.

Quando comparados somente *B. melitensis*, o biovar 1 (isolados 11 e 23) pode ser diferenciado dos demais biovars desta espécie pela presença da banda de 1293 (tabela 12) e o biovar 3 (isolado 25) pela ausência da banda de 726 pb.

Quando comparadas as cepas de *B. suis*, todas diferem entre elas pela presença ou ausência de algum fragmento. O biovar 2 (isolado 28) difere dos demais biovars da espécie pela presença da banda de 534 pb e ausência das bandas de 1293 e 1143 pb. O biovar 4 (isolado 30) não gerou o fragmento de 726 pb como os demais biovars (Tabela 11).

Tabela 11. Relação entre isolados de *B. abortus* e fragmentos amplificados por BOX-PCR.

	¹ 1- biovar 1-C	¹ 2- biovar 1-C	¹ 5- biovar 1-C	¹ 6- biovar 1-C	¹ 7- biovar 1-C	¹ 8- biovar 1-C	¹ 3- biovar 1-R	¹ 4- biovar 1-R	¹ 16- biovar 3-R	¹ 17- biovar 4-R	¹ 18- biovar 5-R	¹ 19- biovar 6-R	¹ 20- biovar 9-R
1645 pb	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
1498 pb	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1293 pb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1143 pb	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
726 pb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
587 pb	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
534 pb	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
218 pb	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

¹Número do isolado; (+) Presença do fragmento; (-) Ausência do fragmento; (C) Isolado de campo; (R) Isolado de referência

É importante salientar que muitos biovars utilizados estavam representados somente por um isolado. Os dados obtidos não foram suficientes para afirmar se as características particulares de determinado biovar pertencem a um grupo ou somente a cepa analisada.

Tabela 12. Relação entre isolados de *Brucella* spp. e fragmentos amplificados por BOX-PCR.

	¹ 9- <i>B. canis</i>	¹ 52 - <i>B. canis</i>	¹ 11- <i>B.melitensis</i> ² bv 1	¹ 23- <i>B.melitensis</i> ² bv 1	¹ 24- <i>B.melitensis</i> ² bv 2	¹ 25- <i>B.melitensis</i> ² bv 3	¹ 12- <i>B.suis</i> ² bv 1	¹ 28- <i>B.suis</i> ² bv 2	¹ 29- <i>B.suis</i> ² bv 3	¹ 30- <i>B.suis</i> ² bv 4
1645 pb	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
1498 pb	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
1293 pb	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
1143 pb	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
726 pb	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
587 pb	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
534 pb	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

¹Número do isolado; ²Biovar; (+) Presença do fragmento; (-) Ausência do fragmento.

A observação dos perfis eletroforéticos gerados pelos diferentes gêneros bacterianos mostra que o gênero *Brucella* pode ser facilmente diferenciado dos demais gêneros testados. Foram observados produtos de amplificação em *E. coli* (isolado 36) e nos gêneros *Phyllobacterium* (isolados 34 e 35), *Ochrobactrum* (isolado 35), *Rhizobium* (isolado 42), *Bradyrhizobium* (isolado 43), *Salmonella* (isolado 37), *Yersinia* (isolado 47) e *Agrobacterium* (isolado 48). Alguns fragmentos apresentados por *Brucella* sp. tem tamanho

semelhante aos fragmentos apresentados pelos outros gêneros testados (Tabela 13 e Figura 3).

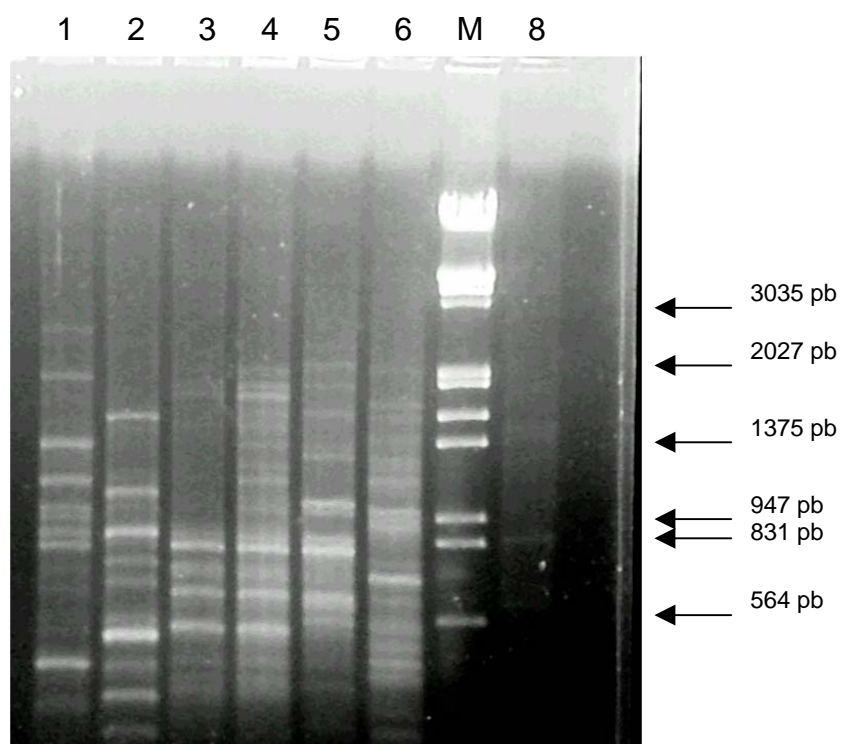


Figura 3. Perfis de BOX-PCR. Canaletas: 1, *B. suis* biovar 2 (isolado 28); 2, *Ochrobactrum* sp. (isolado 33); 3 e 4, *Phyllobacterium* sp. (isolados 34 e 35); 5, *E. coli* (isolado 36); 6, *Salmonella* sp. (isolado 37); M, Marcador molecular λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*; 8, *Rhizobium* sp (isolado 42).

Tabela 13. Fragmentos amplificados em *Brucella* sp. por BOX-PCR comuns a outros gêneros bacterianos.

	¹³³ - <i>Ochrobactrum</i> sp.	¹³⁴ - <i>Phyllobacterium</i> sp.	¹³⁵ - <i>Phyllobacterium</i> sp.	¹³⁶ - <i>E. coli</i>	¹³⁷ - <i>Salmonella</i> sp.	¹⁴² - <i>Rhizobium</i> sp.	¹⁴³ - <i>Bradyrhizobium</i> sp.	¹⁴⁷ - <i>Yersinia</i> sp.	¹⁴⁸ - <i>Agrobacterium</i> sp.
1929 pb	-	-	+	+	-	-	-	-	+
1498 pb	-	+	+	-	-	+	-	-	-
1373 pb	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1293 pb	-	-	-	-	-	-	-	+	+
970 pb	+	-	-	-	-	-	-	-	-
925pb	+	-	-	-	-	+	-	-	+
846 pb	+	-	-	-	-	-	-	-	-
796 pb	+	+	+	+	-	-	-	-	-
672 pb	-	-	-	-	-	+	+	-	-
587 pb	+	+	+	-	-	+	+	-	-
534 pb	+	+	+	-	-	+	-	+	-
409 pb	+	+	+	-	-	-	-	-	-
218 pb	-	-	+	-	-	+	-	-	-

4.5. Dendrogramas

4.5.1. Análise do dendrograma baseado nos resultados dos testes bioquímicos de *Brucella* sp.

Para esta análise, foram consideradas somente as espécies que mostraram produtos de amplificação em BOX-PCR (Figura 4).

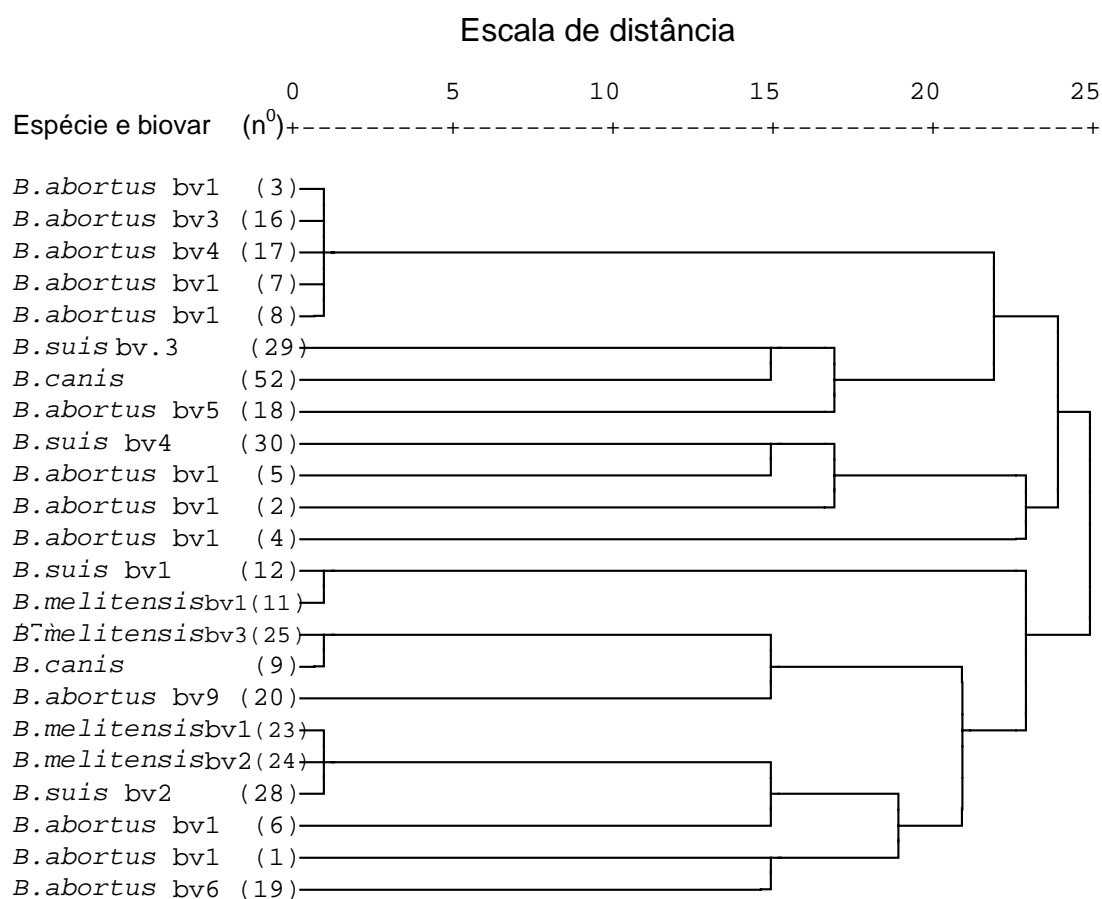


Figura 4. Dendrograma baseado nos testes bioquímicos realizados com *Brucella* sp.

No dendrograma apresentado na figura 4, pode-se observar a formação de somente dois grupos com isolados de uma mesma espécie, mas biovars diferentes. O grupo formado pelos isolados 3, 7, 8, 16 e 17 de *B. abortus* estão em um grupo com 100% de coeficiente de similaridade. Os isolados 1 e 19 de *B. abortus* formam um grupo com 90% de coeficiente de similaridade (Apêndice 8.5). Outros três grupos com coeficiente de similaridade de 100% também foram formados, mas entre espécies diferentes: *B. suis* (isolado 12) e *B. melitensis* (isolado 11), *B. melitensis* (isolado 25) e *B. canis* (isolado 9), e *B. melitensis* (isolados 23 e 24) e *B. suis* (isolado 28). Cinco grupos são observados entre os isolados com nível de similaridade entre 93 e 87% (Apêndice 8.5).

4.5.2. Análise do dendrograma baseado em análises de BOX-PCR de *Brucella* sp. gêneros relacionados

De acordo com o dendrograma obtido através da análise dos isolados que geraram fragmentos por BOX-PCR (Figura 5), pode-se observar que todos os isolados de *Brucella* sp. estão dentro de um grande grupo entre o intervalo de 0 a 5 da escala de distância, com coeficientes de similaridade entre 100 e 74%. Dentro desse grupo, existem 6 grupos de isolados com similaridade de 100%.

Escala de distância

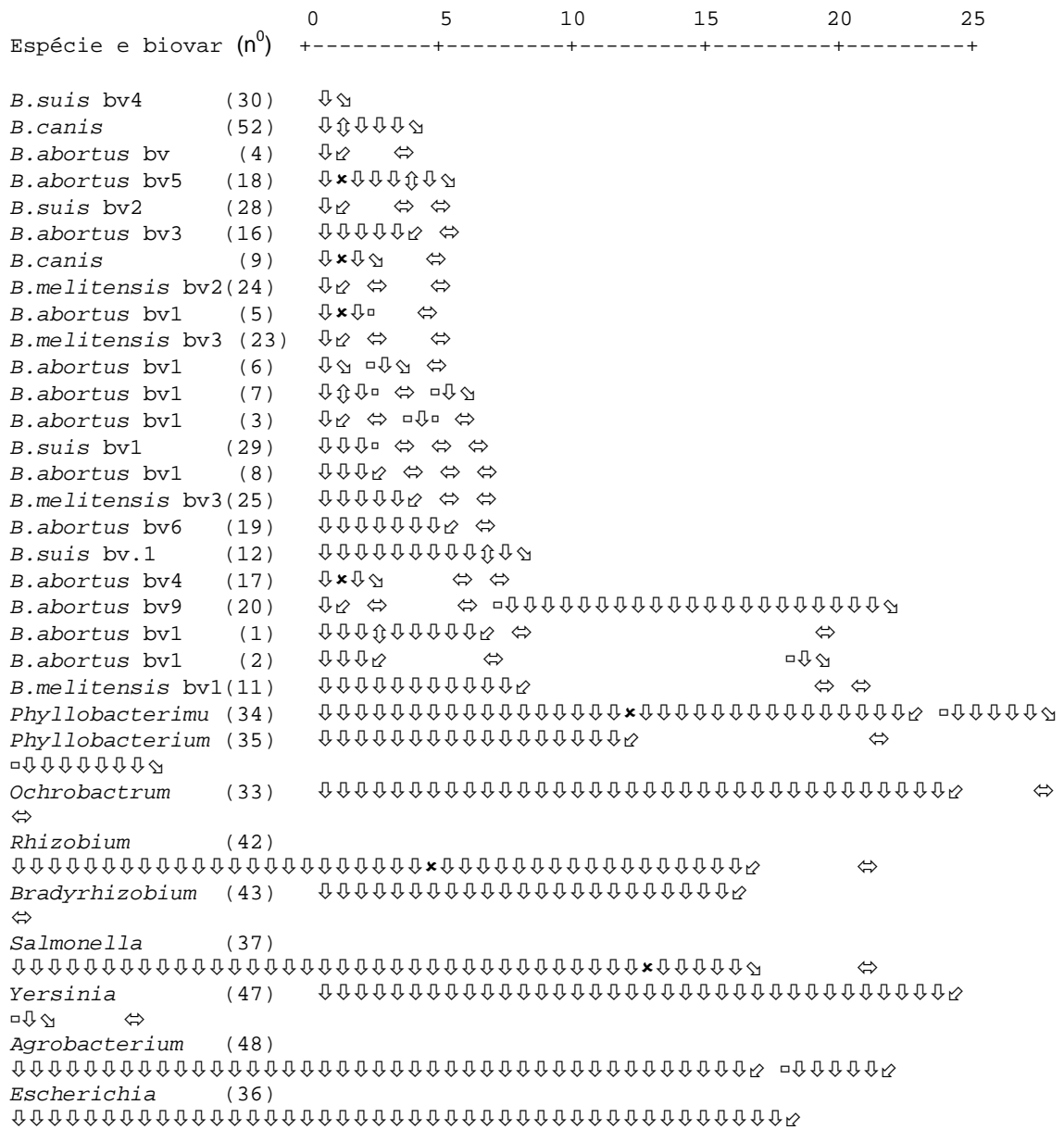


Figura 5. Dendrograma baseado em BOX-PCR em isolados de *Brucella* sp. e gêneros relacionados.

Estudos de hibridização DNA/DNA revelam um alto grau de homologia (acima de 90%) entre as espécies de *Brucella* sp. Consequentemente é proposta uma única espécie para o gênero: *B. melitensis*. As demais espécies seriam consideradas biovars de *B. melitensis* (Verger et al., 1995; Verger et al., 1987).

A maioria dos grupos com 100% de similaridade são formados por diferentes espécie. Destes, um único grupo é formado somente por isolados de uma mesma espécie e biovar: *B. abortus* biovar 1 (isolados 3, 6 e 7). Houve a formação de um segundo grupo de *B. abortus*, mas composto pelos biovars 4 (isolado 17) e 9 (isolado 20) (Figura 5).

Árvores filogenéticas construídas com base na variabilidade genética do gênero *Brucella* mostram que *B. abortus* e *B. melitensis* são mais relacionadas que as outras espécies de *Brucella* sp. Maior relação genética também é detectada entre *B. canis* e *B. suis*, enquanto que *B. neotomae* e *B. ovis* apresentam alto nível de divergência em relação as demais espécies (Michaux-Charachon et al. 1997; Ficht et al. 1996). Essa proximidade entre as espécies também pode ser evidenciada por comparação dos tamanhos dos cromossomos (Moreno et al., 2002). Comparando os dados de proximidade genética já descritos com os dados obtidos no dendrograma de BOX-PCR, pode-se observar a formação de somente um grupo composto por *B. abortus* (isolado 5) e *B. melitensis* (isolado 23). Este grupo tem 100% de coeficiente de similaridade. Entretanto, *B. abortus* forma três grupos com *B. suis* com 100% de similaridade, sendo que em um destes grupos *B. canis* também está incluída (isolados 4, 30 e 52) (Figura 5).

A maioria dos isolados de *Brucella* sp. mostraram padrão de fragmentos semelhante. Alguns isolados diferem de outros pela presença ou ausência de uma única banda, mas estas características não foram suficientes para agrupar isolados de mesmo biovar ou biovars de uma mesma espécie em um único grupo. A caracterização de *Paenibacillus larvae* por BOX-PCR também apresentou padrão similar de fragmentos entre isolados, mas essas diferenças já foram suficientes para reunir os isolados em três grupos (Alippi e Agillar, 1998).

Apesar do alto nível de similaridade entre *Brucella* sp., certa variabilidade em nível de DNA é capaz de diferenciar espécies e biovars deste gênero. Estudos como o realizado por Mercier et al. (1996) puderam discriminar todas as espécies e biovars de *Brucella* sp. com ERIC e REP-PCR. Entretanto, esse grau de discriminação só foi possível com as duas técnicas combinadas. Tcherneva et al. (1996) usando os mesmos oligonucleotídeos, mas com condições de amplificação diferentes, não detectaram tanto polimorfismo entre os isolados testados.

Os demais gêneros bacterianos analisados mostraram coeficientes de similaridade entre 55 a 7% com o gênero *Brucella*, sendo *Phyllobacterium* sp. o gênero geneticamente mais próximo a *Brucella* sp. neste estudo (Apêndice 8.6 e Figura 5). A diferenciação de *Brucella* sp. dos gêneros geneticamente relacionados foi facilmente observada com os perfis eletroforéticos gerados. A presença de bandas comuns entre *Brucella* sp. e os gêneros geneticamente mais próximos, como *Ochrobactrum* sp. e *Phyllobacterium* sp., não dificultou a discriminação entre os gêneros.

Comparando os dados do dendrograma construído a partir dos resultados dos testes bioquímicos de *Brucella* sp. com os dados do dendrograma baseado em BOX-PCR, pode-se observar que somente os isolados 3 e 7 de *B. abortus* fazem parte do mesmo grupo nos dois dendrogramas. Nenhuma outra relação foi encontrada quando comparados os resultados dos testes bioquímicos e os perfis eletroforéticos gerados por BOX-PCR.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os testes bioquímicos, realizados em nosso laboratório, com as amostras de *Brucella* sp. não foram suficientes para a diferenciação entre algumas espécies do gênero. Alguns resultados foram comuns a todos os isolados de *Brucella* sp.

A PCR gênero-específica para *Brucella* sp. gerou um fragmento de mesmo tamanho molecular para todos os isolado do gênero. A técnica se mostrou rápida, segura, reprodutível e específica, sendo considerada vantajosa sobre as provas bioquímicas na identificação do gênero *Brucella*.

Oito fragmentos gerados por BOX-PCR são comuns a todos os isolados testados, podendo ser utilizados na caracterização do gênero *Brucella*.

Os produtos de amplificação de BOX-PCR não permitiram a reunião de biovares de uma mesma espécie ou espécies de *Brucella* sp. geneticamente mais próximas em grupos distintos.

A presença ou ausência de bandas em determinados isolados diferencia biovares dentro de uma mesma espécie de *Brucella*. Devido ao pequeno número de isolados testados, não foi possível determinar se tais características pertencem a um determinado biovar ou se são próprios da cepa testada.

A amplificação de fragmentos de DNA com tamanho similar aos fragmentos de *Brucella* sp. por BOX-PCR a partir dos gêneros bacterianos

geneticamente relacionados não dificultou a discriminação entre os gêneros testados.

Nenhuma relação foi encontrada quando comparados os resultados dos testes bioquímicos e os perfis eletroforéticos gerados por BOX-PCR.

A ausência de amplificação para 19 dos 51 isolados testados indica que novos testes devem ser realizados para a obtenção de melhores resultados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como proposta para a continuidade deste trabalho faz-se as seguintes sugestões: melhorar o protocolo de BOX-PCR testado, associar técnica de BOX-PCR com outras técnicas de biologia molecular e utilizar um número maior de isolados de cada espécie e biovar de *Brucella* sp.

Dessa forma, as informações geradas neste trabalho poderão ser utilizadas na caracterização de espécies e biovares de *Brucella*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucellose. In: **Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux**. 2^a ed. Paris: OIE ed., 1989. p. 14–38.

ALIPPI, A. M.; AGUILAR, O. M. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polimerase chain reaction and BOX primers. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.27, p. 21-27, 1998.

ALLARDET-SERVENT, A. ; BOURG, G. ; RAMUZ, M. ; PAGES, M.; BELLIS, M.; ROIZES, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4603-4607, 1988.

ALLARDET-SERVENT, A. ; CARLES-NURIT, M.J.; MICHAUX, S.; BOURG, G.; RAMUZ, M. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella* as shown by restriction fragment analysis and partial physical map *In* ADAMS, L. G.: **Advances in brucellosis research**. Texas: Texas A & M University Press, USA, 464, 1990.

ALMONIN, S.; SALEEM, M.; AL-MUTAWA, Q. The use of an arbitrarily primed PCR product for the specific detection of *Brucella*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 381-385, 1999.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Techniques for the brucellosis laboratory**: Bacteriological methods. Paris: INRA, 1988, p. 190.

AMIN, A.S.; HAMDY, M.E.R.; IBRAHIM, A.K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polimerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, v.83, n.1, p. 37-44, 2001.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *B. abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271 – 275, 1992.

BAILY, K.M.; WEST, D.M. Restriction endonuclease (*Eco* RI) analysis of *Brucella ovis* DNA. **New Zeland Veterinary Journal**, New Zealand, v.35, p. 161-162, 1987.

BENEDUZI, A.S.; **Identificação e caracterização de *Paenibacillus* spp. provenientes de amostras de água e de solo.** 137f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

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

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

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 et RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1640-1642, 1995.

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

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**, Washington, v. 7, n. 5, p. 835-839, 2000.

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

CLOECKAERT, A.; VERGER, M. J.; GRAYON, M.; PAQUET, J.; GARIN-BASTUJI, B.; FOESTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and infection**, Washington, v. 3, p. 729-738, 2001.

CLOECKAERT, A.; VERGER, M. J.; GRAYON, M.; VIZCAÍNO, N. Molecular and immunological characterization of major outer membrane proteins of *Brucella*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 1-8, 1996.

CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; PAQUET, J.; BOWDEM, R. A.; ELZER, P. H. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v.90, p. 229-247, 2002.

DA COSTA, M.; GUILLOU, J.P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIEBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, Saga, v. 81, p. 267-275, 1996.

DE LEY, J.; MANNHEIM, W.; SEGERS, P.; LIEVENS, A.; DENIJN, M.; VANHOUCHE, M.; GILLIS, M. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 35-42, 1987.

DOMBEK, P.E.; JOHNSON, L.; ZIMMERLEY, S.T.; SADOWSKY, M.J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.6, p.2572-2577, 2000.

EWALT, D.R. & BRICKER, B.J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and vaccine strains, 19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A. & HALLING, S.M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p. 79-83, 1992a.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A. HALLING, S.M.; STICH, R.W. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7778-7783, 1992b.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; SANBORN, M.R. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 216-227, 1990a.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; SANBORN, M.R. Rapid, sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. **Biotechnology Technique**, Washington, v. 4, p. 31-34, 1990b.

FICHT, T. A.; BEARDEN, S. W.; SOWA, B. A.; ADAMS, L. G.; DNA sequence and expression of 36-Kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.57, n.11, p. 3281-3291, 1989.

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

GARCIA-CARRILLO, C. Brasil In: LA BRUCELOSIS de los animales en América y su relación con la infección humana. Paris: OIE, 1987. p. 43-70.

GILLESPIE, J.H.; TIMONEY, J.F. The genus *Brucella*. In: HAGAN and BRUNER'S infectious diseases of domestic animals. 7th. Ed. Londres: Cornell University press, 1981. p. 127-150.

GRAYON, M.; VERGER, J.M.; TIBOR, A.; WANSARD, V.; LETESSON, J.J. Polymorphisme de six gènes codant pour des proteines membranaires ou cytoplasmiques des *Brucella*. In: CONGRÈS SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, 4., 1995, Tours.[S.l. : s.n.], [1995].

GRIMONT, F.; VERGER, J-M.; CORNELIS, P.; LIMET, J.; LEFEVRE, M.; GRAYON, M.; REGNAULT, B.; VAN BROECK, J.; GRIMONT, P.A.D. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 143, p. 55 -65, 1992.

HALLING, S. M. & ZEHR, E. Polimorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n.12, p.6637-6640, 1990.

HALLING, S.M.; BRICKER, B.J. Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* spp.: Bru-RS1 and Bru-RS2. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 14, n. 4, p. 681-689, 1994.

HALLING, S.M.; DETILLEUX, P.G.; TATUM, F.M.; JUDGE, B.A.; MAYFIELD, J.E. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. **Infection and Immunity**, Maryland, v. 59, p. 3863-3868, 1991.

HALLING, S.M.; TATUM, F.M.; BRICKER, B.J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. **Gene**, Netherlands, v. 133, p. 123-127, 1993.

HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2099-2101, 1992.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: The Willians & Wilkins, 1994.

HOYER, B.H.; McCULLOUGH, N.B. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 96, p. 1783-790, 1968a.

HOYER, B.H.; McCULLOUGH, N.B. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 95, p. 444-448, 1968b.

INPPAZ. Instituto Panamericano de Protecion de Alimentos y Zoonoses. **Documento de trabajo para la Reunion sobre prevencion, Control y erradicacion de la brucellosis en America Latina y el Caribe**. Buenos Aires: Martinez, 1994.

JARVIS, G.N.; KURLOVIC, A.; HAY, A.G.; RUSSEL, J.B. The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains. **FSMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 49-56, 2000.

JUMAS-BILAK, E.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; O'CALLAGHAN, D. RAMUZ, M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Molecular Microbiology**, Salen, v. 27, n.1, p. 99-106, 1998.

KIM, W.; HONG, Y.; YOO, J.; LEE, W.; CHOI, C.; CHUNG, S. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprint. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 21-27, 2002.

LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O.; GARCÍA-CANTÚ, J.; LÓPEZ-MERINO, A. & MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 75 p. 91-97, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3087-3090, 1995.

LIPMAN, L.J.A.; DE NIJS, A.; LAM, T.J.G.M.; GAASTA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 42, p. 13-19, 1995.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n.34, 1992.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, P.A.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.13, p. 3479-3483, 1992.

MATAR, G.M.; KHNESSER, I.A.; ABDELNOOR, A.M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 2, p. 477-478, 1996.

McFADDIN, J.F. **Biogeochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 2000.

McGILLIVERY, D.J.; WEBBER, J.J.; EDWARDS, L.D. Restriction endonuclease analysis of *Brucella abortus*. **Research Veterinary Science**, London, v. 45, p. 251-252, 1988.

MERCIER, E.; JUMAS-BILAK, E.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n.5, 1996.

MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; JUMAS-BILAK, E.; GUIGUETALET, P.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D. RAMUZ, M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 10, p. 3244-3240, 1997.

MICHAUX-CHARACHON, S.; JUMAS-BILAK, E.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOURG, G.; BOSCHIROLI, M. L.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 90, p. 581-585, 2002.

MORENO, E. Genome evolution within the alpha *Proteobacteria*: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 22, p. 255-275, 1998.

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

MORENO, E.; STACHEBRANDT, E.; DORSCH, M.; WOLTERS, J.; BUSCH, M.; MAYER, H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 3569-3576, 1990.

MUZNY, D.M.; FICHT, T.A.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. DNA homology of *Brucella abortus* strains 19 and 2308. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 50, p. 655-661, 1989.

O'HARA, M.J.; COLLINS, D.M.; DE LISLE, G.W. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 10, p. 425-429, 1985.

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

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER, F.P. *Brucella* In GUERREIRO et al. **Bacteriologia especial**, Porto Alegre, Sulina, p. 214-244, 1984.

RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.

RIGBY, C.E. & FRASER, A.D.E. 1989. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 53, p. 326-330, 1989.

RIJPENS, N.P.; JANNES, G.; ASBROECK, M.V.; ROSSAU, R.; HERMAN, L.M. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacers probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1683-1688, 1996.

ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M. & LOPEZ-GONI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 615-617, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS NETO, L.L.; COSTA, G.P.; SIMAAN, C.K.; CORREIA-LIMA, F.A. Abscesso esplênico por *Brucella abortus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, p. 353-355, 1999.

SNELLING, A. M.; GERNER-SMIDT, P.; HAWKEY, P. M.; HERITAGE, J.; PARNELL, P.; PORTER, C.; BODEHAM, A. R.; INGLIS, T. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n.5, p. 1193-1202, 1996.

TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; NAYDENSKY, C.; HERMAN, L. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 51, p.169-78, 1996.

VAN BELKUM, A.; SLUIJTER, M.; GROOT, R. DE; VERBRUGH, H.; HERMANS, W. M. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n.5, p. 1176-1179, 1996.

VERGER, J. M.; GRAYON, M.; CHASLUS-DANCLA, E.; MEURISSE, M.; LAFONT, J.P. Conjugative transfert and *in vitro/ in vivo* stability of the broad-host-range incP R751 plasmid in *Brucella* spp. **Plasmid**, New York, v. 29, p.142-146, 1993.

VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. & GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 35, p. 292-295, 1985.

VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; GRAYON, M. Taxonomy of the genus *Brucella*. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology**, Washington, v.138, p. 235 – 238, 1987.

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

VERGER, M. J.; GRAYON, M.; TIBOR, A.; WANSARD, V.; LETESSON, J.J.; CLOECKAERT, A. Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein- or cytoplasmic protein-specific gene probes. **Research Microbiology**, Amsterdam, v. 149, p. 509-517, 1998.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n.24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprint of bacterial genomes. In BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.; WEINSTOCK, G. M. (eds) **Bacterial Genomes Physical Structure and Analysis**, New York: Chapman & Hall, p. 437-454, 1998.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINUESA, P.; RADEMARKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2096-2104, 1998.

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

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

ZAVAGLIA, A.G.; URRAZA, P.; ANTONI, G. Characterization of *Bifidobacterium* strains using box primers. **Molecular Biology/Genetics**, New York, v.6, p.169-177, 2000.

ZEHR, E.S. & HALLING, S.M. A comparison of proteins and genomic DNA of species and biovars of *Brucella* In ADAMS, L.G. **Advances in brucellosis research**. Texas: Texas A & M University Press, USA, 1990. p. 477-478.

8. APÊNDICES

8.1. Meios de cultura para crescimento e isolamento

8.1.1. TY

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,87 g
Água destilada	1000 mL
pH 6,8-7,2	

8.2. Soluções utilizadas na extração de DNA

8.2.1. TE1

Tris-HCl (pH 7,8)	10 mM
EDTA (pH 7,8)	25 mM

8.2.2. TE2

Tris-HCl (pH 7,8)	10 mM
EDTA (pH 7,8)	1 mM

8.2.3. Solução de NaCl 5M

NaCl	292,1g
Água destilada	1000 mL

8.2.4. Solução de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio)

SDS	20g
Água destilada	100 mL

8.2.5. Fenol tamponado

Fenol	250 mL
Água destilada	50 mL
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	6 mL
M-cresol	12,5 mL
β -mercaptoetanol	0,5 mL
NaOH 1N	7,5 mL
pH 7,8	

8.3. Soluções utilizadas para a corrida em gel de agarose**8.3.1. Brometo de etídeo**

Brometo de etídeo	0,50 mg
Álcool etílico	1000 mL

8.3.2. Gel de agarose

Agarose	0,8g (gel 8%) ou 1g (gel 1%)
Tampão TBE	100 mL

8.3.3. Tampão TBE 5X

Tris	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M (pH8)	20 mL
Água destilada	1000 mL

8.3.4. Tampão de amostra

Azul de bromofenol	0,25%
Glicerol em água	30%

8.4. Soluções para PCR**8.4.1. Soro albumina bovina (BSA) (8ng/ μ l)**

Soro albumina bovina	4 μ l
Água Milli-Q estéril	96 μ l

