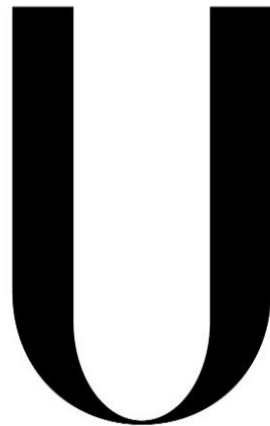


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Tipagem Molecular de Estirpes de *Brucella* spp.

Sandra Filipa Coutinho Protásio

Dissertação de Mestrado

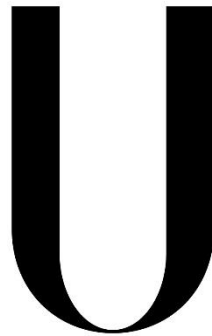
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Tipagem Molecular de Estirpes de *Brucella* spp.

Sandra Filipa Coutinho Protásio

Orientação:

Mestre Ana Cristina Pelerito Gonçalves (INSA)

Prof^a Doutora Deodália Dias (FCUL)

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2015

Agradecimentos

À Direção do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela possibilidade que me foi dada para realizar o estágio curricular na Unidade de Resposta à Emergência, Departamento de Doenças Infeciosas.

À minha orientadora Ana Pelerito, do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, agradeço a amabilidade e confiança com que me recebeu, a sua orientação e disponibilidade. Agradeço também a boa-disposição com que sempre me tratou e transmitiu os seus conhecimentos e experiência.

À Professora Doutora Deodália Dias, professora e coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, agradeço a sua disponibilidade e ajuda ao longo do mestrado, e a prontidão com que aceitou a coorientação desta dissertação.

À Rita Cordeiro, um obrigada pela simpatia com que me recebeu, pelo apoio, e por estar sempre disponível a ajudar e a partilhar os seus conhecimentos.

À Doutora Vera Manageiro pela simpatia, disponibilidade e pela ajuda imprescindível com o *software BioNumerics*.

Aos meus colegas e amigos, sobretudo ao Gerson, obrigada pela enorme amizade, apoio, sentido de humor e por todos os bons momentos passados na sua companhia.

Agradeço ao meu avô Carlos por tudo o que fez por mim e à minha avó São por todo o apoio que me continua a dar.

Um agradecimento muito especial ao João, por tudo o que tem feito, pela ajuda em tudo o que preciso, compreensão e dedicação. Um enorme obrigada por estar sempre presente, pelo interesse e carinho que tem sempre para comigo.

Por fim, e mais importante, aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu pai, agradeço a confiança em mim, incentivo e apoio em tudo o que faço, que possibilitou não só a minha dedicação aos estudos mas também ao desporto.

À minha mãe, agradeço todos os sacrifícios, carinho e preocupação constantes comigo. Sem ajuda dela teria sido impossível, ao longo destes anos, conciliar a vida académica com os treinos e a competição.

A ambos um enorme obrigada, por estarem sempre presentes e serem as pessoas mais importantes da minha vida.

Uma menção especial à minha avó Amália, que teria ficado muito orgulhosa por todas as minhas vitórias.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUÇÃO	1
1. Perspetiva Histórica	1
2. Distribuição Geográfica	2
3. Impacto e fatores que influenciam a doença	3
4. Género <i>Brucella</i>	5
4.1. Características morfológicas	5
4.2. Genoma	6
4.3. Taxonomia e Filogenia de <i>Brucella</i>	6
5. Brucelose Humana	10
5.1. Transmissão	10
5.2. Sintomas	10
5.3. Terapêutica	11
5.4. Diagnóstico	12
5.4.1. Cultura	12
5.4.2. Testes serológicos	13
5.4.3. Técnicas Moleculares	14
6. Virulência	15
6.1. Fatores de Virulência	16
6.1.1. LPS	16
6.1.2. BvrR/BvrS	16
6.1.3. Sistemas de Secreção Tipo IV (VirB)	17
6.2. Efetores Bacterianos	18
6.2.1. BAB1_0296	18
6.2.2. BAB1_1101	18
6.2.3. BAB1_1533	19

7. Métodos de Tipagem e Caracterização de Estirpes de <i>Brucella</i>	19
7.1. <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR).....	19
7.2. Eletroforese em Gel de Agarose	20
7.3. Sequenciação de DNA	21
7.4. <i>Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis</i> (MLVA).....	21
8. Objetivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533	24
1.1. Cultura de estirpes de <i>Brucella</i>	24
1.2. Extração de DNA	25
1.3. Amplificação dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533	26
1.4. Análise dos produtos amplificados por PCR	26
1.5. Sequenciação de DNA	27
1.6. Análise Bioinformática	27
2. <i>Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis</i> (MLVA)	28
2.1. Cultura de estirpes de <i>Brucella</i>	28
2.2. Extração de DNA	29
2.3. Amplificação de VNTRs	29
2.4. Análise dos produtos amplificados por PCR	29
2.5. Análise Bioinformática (MLVA)	30
III. RESULTADOS	31
1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533	31
1.1. Estudo da diversidade genómica dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533, nas estirpes de <i>Brucella</i> em estudo.	31
1.2. Avaliação da variabilidade genética das sequências dos genes BAB1	33
1.2.1. Sequências do gene BAB1_0296	33
1.2.2. Sequências do gene BAB1_1101	34
1.2.3. Sequências do gene BAB1_1533	36
1.3. Cálculo dos parâmetros evolutivos dos genes BAB1	37
1.3.1. Gene BAB1_0296.....	39
1.3.2. Gene BAB1_1101.....	39
1.3.3. Gene BAB1_1533.....	41

1.4. Análise filogenética das sequências dos genes BAB1	42
1.4.1. Sequências do gene BAB1_0296	43
1.4.2. Sequências do gene BAB1_1101	43
1.4.3. Sequências do gene BAB1_1533	44
2. Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)	45
2.1. Análise de VNTRs (<i>Variable Number Tandem Repeats</i>)	45
2.2. Análise MLVA16 de diferentes estirpes de <i>Brucella</i> e relações entre si.	46
IV. DISCUSSÃO.....	49
1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533	49
2. Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)	54
V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	56
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
VII. ANEXOS	68
Anexo I – Sequência de nucleótidos dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533	69
Anexo II – Sequência de nucleótidos dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos <i>loci</i> do MLVA16	70
Anexo III – Tabela de correspondência entre o tamanho dos alelos de <i>Brucella</i> e o número de repetições	71
Anexo IV – Marcador de peso molecular <i>HyperLadder</i> [®] IV 100pb.....	72
Anexo V – Marcador de peso molecular <i>GeneRuler</i> [®] DNA Ladder 50pb.....	73
Anexo VI – Alinhamento completo das sequências do gene BAB1_0296	74
Anexo VII – Alinhamento completo das sequências do gene BAB1_1101.	75
Anexo VIII – Alinhamento completo das sequências do gene BAB1_1533	76

Lista de Abreviaturas

μl – microlitro

μm – micrómetro

μM – micromolar

ml – mililitro

mM – milimolar

mm – milímetro

°C – graus Celsius

AMOS PCR – *Abortus–Melitensis–Ovis–Suis Polymerase Chain Reaction*

BCV – *Brucella Containing Vacuole*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

Brucella spp. – Espécies pertencentes ao género *Brucella*

BSL-3 – *Biosafety Laboratory Level 3*

Bv – *biovar*

ChrI – *Chromossome I* (Cromossoma I)

ChrII – *Chromossome II* (Cromossoma II)

CO₂ – Dióxido de carbono

dATP – 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP – 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

DDI – Departamento de Doenças Infeciosas

dGTP – 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ECDC – *European Center for Disease Control*

EFTA – *European Free Trade Association*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EU – *European Union* (União Europeia)

G+C – Guanina + Citosina

HGDI – *Hunter-Gaston Diversity Index* (Índice de Diversidade Hunter-Gaston)

H₂O – Água

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Ka – Frequência de substituições não sinónimas

Ks – Frequência de substituições sinónimas

LPS – Lipopolissacárido

Mb – Megabase

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Major de Histocompatibilidade)

min – minuto

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MLVA – *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*

MP – *Maximum Parsimony* (Máxima Parcimónia)

NJ – *Neighbour Joining*

Nk – Natural Killer

OIE – *Office International des Epizooties* (Organização Mundial de Saúde Animal)

OMS – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO)

ORF – *Open Reading Frame*

Pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RE – Retículo Endoplasmático

R-LPS – *Rough Lipopolysaccharide* (Lipopolissacárido Rugoso)

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RT-PCR – *Real-time PCR* (PCR em Tempo Real)

S-LPS – *Smooth Lipopolysaccharide* (Lipopolissacárido Liso)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – *Single Nucleotid Polimorphism* (Polimorfismo de nucleótido único)

SNR – *Single Nucleotid Repetition* (Repetição de nucleótido único)

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TMP-SMZ – trimetoprim-sulfametoxazol

TSB – *Trypticase soy broth*

T4SS – *Type IV Secretion System* (Sistema de Secreção Tipo IV)

UPGMA – “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”

UREB – Unidade de Resposta à Emergência e Biopreparação

UTI – Unidade de Tecnologia e Inovação

VNTRs – *Variable Number Tandem Repeats* (Repetições em *tandem* de número variável)

Índice de Figuras

Figura 1. Taxas de notificação de brucelose humana na EU/EFTA, 2012	3
Figura 2. Estrutura do LPS de <i>Brucella</i> , constituído pelo Lípido A, core de oligossacárido e o polissacárido O	6
Figura 3. Árvore filogenética representando as relações entre as espécies reconhecidas de <i>Brucella</i>	8
Figura 4. Produtos de amplificação do gene BAB1_0296 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed®	31
Figura 5. Produtos de amplificação do gene BAB1_1101 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed®	32
Figura 6. Produtos de amplificação do gene BAB1_1533 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed®	32
Figura 7. Alinhamento dos primeiros 130 nucleótidos das sequências obtidas para o gene BAB1_0296	33
Figura 8. Alinhamento dos primeiros 80 resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_0296	34
Figura 9. Alinhamento, dos 141 aos 280 nucleótidos, das sequências obtidas para o gene BAB1_1101	35
Figura 10. Alinhamento dos primeiros 100 resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_1101	35
Figura 11. Alinhamento, dos 261 aos 390 nucleótidos, das sequências obtidas para o gene BAB1_1533	36

Figura 12. Alinhamento dos resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_1533	37
Figura 13. Árvore filogenética das 50 sequências do gene BAB1_1101	43
Figura 14. Árvore filogenética das 40 sequências do gene BAB1_1533	44
Figura 15. Dendograma baseado no ensaio MLVA16 mostrando as relações de 20 estirpes de <i>Brucella</i> em estudo	47
Figura 16. Dendograma baseado no ensaio MLVA8 mostrando as relações de 33 estirpes de <i>Brucella</i> em estudo	47
Figura 17. Dendograma baseado no ensaio MLVA11 mostrando as relações de 31 estirpes de <i>Brucella</i> em estudo	48

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécies de <i>Brucella</i> , incluindo as novas estirpes, os respectivos hospedeiros e patogenicidade para o Homem.....	9
Tabela 2. Estirpes de <i>Brucella</i> utilizadas no estudo dos efetores BAB1	24
Tabela 3. Estirpes de <i>Brucella</i> utilizadas no ensaio MLVA16	28
Tabela 4. Cálculo dos parâmetros evolutivos relativos às sequências nucleotídicas do gene BAB1_1101	40
Tabela 5. Cálculo dos parâmetros evolutivos relativos às sequências nucleotídicas do gene BAB1_1533	42
Tabela 6. Cálculo do <i>Hunter-Gaston Diversity Index</i> (HGDI) para os painéis do MLVA16	45

Resumo

A brucelose é uma das zoonoses bacterianas mais comuns a nível mundial, podendo infectar o Homem e animais, constituindo por isso um importante problema de saúde pública. Em Portugal, a brucelose é uma doença endémica e encontra-se entre as 3 zoonoses com maior incidência no país. É causada por bactérias Gram-negativas do género *Brucella*. As bactérias deste género são muito próximas geneticamente, apresentando uma homologia superior a 90%, o que dificulta a sua identificação e genotipagem. Sendo uma bactéria intracelular, a patogenicidade de *Brucella* baseia-se na sua capacidade de penetrar, sobreviver e de se multiplicar no interior das células do hospedeiro. Um dos elementos envolvidos na virulência de *Brucella* são as proteínas efetoras, secretadas para o interior das células do hospedeiro, através de um sistema de secreção (T4SS).

O objetivo deste trabalho foi a caracterização e o estudo da variabilidade genética de 3 genes efetores (BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533), e a genotipagem molecular de estirpes de *Brucella*, pertencentes à coleção do INSA, utilizando metodologias moleculares, tais como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a sequenciação de DNA e MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis*), bem como métodos bioinformáticos para análise de sequências e inferência filogenética. No estudo dos efetores verificou-se uma grande homologia entre as sequências, evidenciando a elevada conservação destes genes possivelmente associados à virulência.

O ensaio MLVA16 revelou-se altamente discriminatório, com os *loci* do painel 2B a apresentar valores de Índice de Diversidade mais elevados (>0,7). Nos estudos de filogenia realizados é de salientar que as estirpes de *B. abortus* e *B. melitensis* se mostraram próximas entre si e as estirpes pertencentes a *B. suis* mais divergentes e próximas entre si.

A caracterização molecular de *Brucella* e o desenvolvimento de métodos de tipagem, cada vez mais robustos, é de grande importância em diversas áreas, como diagnóstico, estudos de diversidade genética, em contexto evolutivo ou vigilância epidemiológica, caracterização de surtos e investigação de mecanismos de virulência.

Palavras-chave: *Brucella*, virulência, efetores, MLVA16, tipagem molecular.

Abstract

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease that can infect both humans and animals and therefore is a major public health concern. In Portugal, brucellosis is an endemic disease and it is among the three zoonoses with the highest incidence in the country.

It is caused by Gram negative bacteria of the genus *Brucella*. The bacteria of this genus are very close genetically, with a degree of homology higher than 90%, which causes their identification and genotyping to be challenging.

Being an intracellular bacterium, *Brucella* pathogenicity is based on its ability to penetrate, survive and multiply within the host cell. Effector proteins are one of the many factors involved in the virulence of *Brucella* and they are secreted within the host cells, through a Type 4 Secretion System (T4SS).

The aim of this work was to assess the genetic variability of three effector genes (BAB1_0296, BAB1_1101 and BAB1_1533) and genotyping of *Brucella* strains from INSA's repository, using molecular methods, such as PCR (*Polymerase Chain Reaction*), DNA sequencing, MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis*), and bioinformatics tools for sequence analysis and phylogenetic studies.

The effector's study showed a high degree of homology between the sequences, suggesting the high conservation of these potential virulence genes.

The MLVA16 assay proved to be highly discriminatory, with the *loci* of panel 2B showing the higher Diversity Index values (>0.7). The phylogenetic reconstruction revealed the close relationship between *B. abortus* and *B. melitensis* and grouped *B. suis* as the most divergent species.

Molecular characterization of *Brucella* and the development of more robust typing methods is of great importance in areas such as diagnosis, genetic diversity studies, in both evolutionary and epidemiological surveillance contexts, outbreaks characterization and virulence mechanisms investigation.

Keywords: *Brucella*, virulence, effectors, MLVA16, molecular typing.

I. Introdução

1. Perspetiva Histórica

A brucelose é uma doença antiga [89] e uma das zoonoses bacterianas mais frequente a nível mundial, constituindo um importante problema de saúde pública [54].

A Brucelose afeta várias espécies de mamíferos, terrestres e marinhos, domésticos ou selvagens [12, 65], e pode também ser transmitida ao homem, havendo anualmente mais de meio milhão de novos casos a nível mundial. A sua prevalência excede os 10 casos por 100000 habitantes, em alguns países endémicos [76]. No entanto, permanece uma doença sub-diagnosticada e negligenciada, supondo-se que o número estimado de casos não reportados seja dez vezes superior [12, 40, 42].

Esta infeção é causada pela bactéria do género *Brucella* [75]. O género *Brucella* contém atualmente 11 espécies, das quais *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* e raramente *B. canis* podem provocar doença no Homem. *B. melitensis* é a espécie mais virulenta e mais prevalente em todo o Mundo [45, 66, 75, 104].

A brucelose era, inicialmente, conhecida a nível local como Febre de “Malta”, “Gibraltar” ou de “Creta” e frequentemente confundida com outras febres [104]. Em 1887, David Bruce isolou pela primeira vez o *Micrococcus melitensis* (*M. melitensis*), a partir do baço de um soldado Britânico, morto devido a esta doença, comum entre os militares em Malta. Durante quase vinte anos, após o isolamento de *M. melitensis*, pensava-se que esta doença fosse transmitida por um vetor. Somente em 1905, Themistocles Zammit demonstrou, acidentalmente, a natureza zoonótica da doença, ao isolar *M. melitensis* a partir de leite de cabra [42]. Em 1897, um veterinário Dinamarquês, L.F. Benhard Bang, havia descoberto também um agente, que causava aborto no gado, *Bang bacillus* (*B. abortus*). Mais tarde, Alice Evans, cientista norte americana, confirmou a relação entre a doença descrita por L.F. Benhard Bang e a Febre de “Malta”, renomeando o género *Brucella* em homenagem a David Bruce [89].

Algumas espécies do género *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) foram classificadas como agentes de bioterrorismo de classe B. Por conseguinte, são passíveis de serem utilizadas como armas biológicas devido à sua baixa dose infecciosa ($= < 10^2$ organismos), facilidade de disseminação [53], carácter prolongado e patogénico e

erradicação dispendiosa no caso de um possível evento de bioterrorismo [4, 45]. A inclusão de *Brucella*, na lista de agentes com potencialidades para serem utilizados como arma biológica reforçou a preocupação das autoridades de saúde e de sanidade animal. Aumentando, assim, o seu interesse por esta infecção [49]. Isto obriga os laboratórios de referência a uma constante atualização e melhoria dos seus métodos de detecção rápidos, tanto em amostras humanas, como de alimentos e animais [103, 108]. A manipulação deste agente deve ser feita, obrigatoriamente, em laboratórios de Biossegurança de nível 3 (BSL-3) [8, 109].

2. Distribuição Geográfica

No que diz respeito à distribuição geográfica da doença, as áreas mais afetadas são a Bacia do Mediterrâneo, o Médio Oriente, a América Central e do Sul, a Ásia Central e o Subcontinente Indiano [4, 76].

O Médio Oriente é considerado uma área endémica; cinco dos dez países com incidência mais alta da doença encontram-se nesta região, sendo a Síria o país com maior incidência a nível mundial [76]. Na Ásia Central e Ocidental, a prevalência da doença é muito alta, com a Mongólia a ser o segundo país com maior incidência. Na China um programa de vacinação massiva, que teve lugar entre 1964 e 1976 levou ao declínio da doença até 1994. Desde então tem-se vindo a registar um aumento de casos [76]. Em África, a doença é considerada endémica nas regiões do norte do continente. Na África subsariana, a doença existe, tendo sido reportados surtos em alguns países, todavia, os dados são ainda muito escassos [77]. Na América Latina, o México permanece um dos reservatórios mais importantes de brucelose humana. A brucelose animal afeta toda a América Central. Contudo, a doença humana não é endémica, exceto na Guatemala e no Panamá. A América do Sul é tradicionalmente uma zona endémica de brucelose humana [76].

Na Europa (**figura 1**), os casos de brucelose têm evidenciado uma tendência decrescente, sendo esta menos acentuada nos últimos dois anos [34]. Devido a programas de erradicação, países como Áustria, Bélgica, Republica Checa, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Eslováquia, Suécia, Reino Unido, Noruega e Suíça, são atualmente considerados oficialmente livres de brucelose,

registando apenas casos de doença humana importados [31]. A Turquia [55] e os países dos Balcãs são zonas muito afetadas pela doença assim como a bacia do Mediterrâneo [77].

Os países com maior incidência de brucelose humana na Europa são a Grécia, a Espanha e Portugal. Tendo, em 2012, contabilizado 67,7% do número total de casos reportados na Europa [31]. Em Portugal, a brucelose é uma doença de notificação obrigatória, cuja casuística a coloca entre as 3 zoonoses com maior incidência no país, tendo sido assinalados casos em todas as regiões do Continente [28].

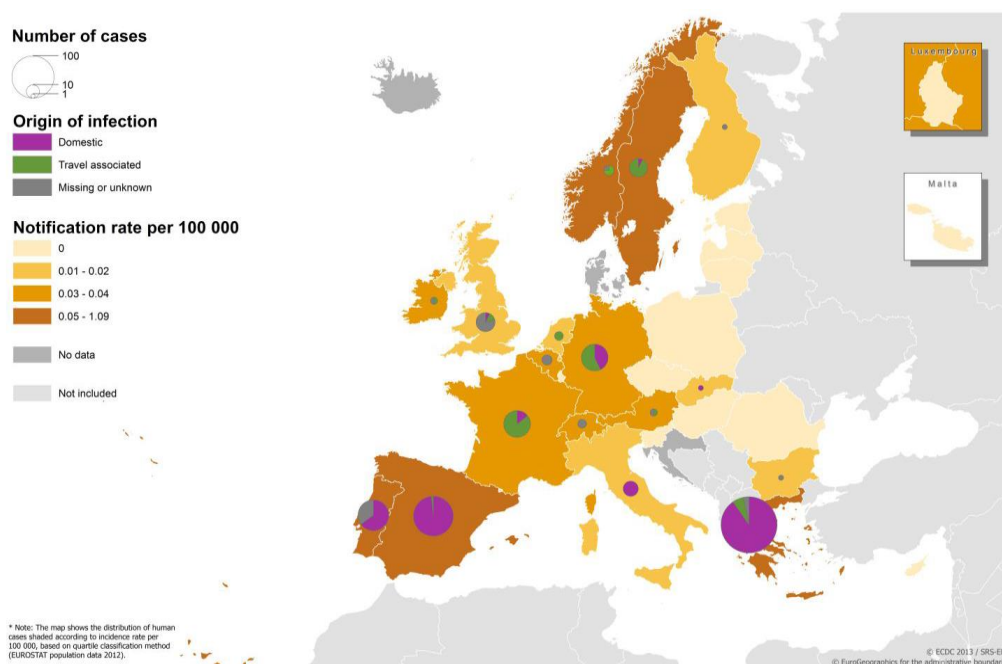


Figura 1. Taxas de notificação de brucelose humana na EU/EFTA, 2012. O mapa mostra, a sombreado, a distribuição de casos de infeção em humanos [31].

3. Impacto e fatores que influenciam a doença

A brucelose afeta o bem-estar das populações, não só por causar doença no Homem e animais, mas também pelo impacto económico que causa pois implica prejuízos elevados nas explorações agropecuárias [76], uma vez que causa abortos em fêmeas grávidas, reduz a produção de leite e causa infertilidade em animais infetados. Levando a que, muitas vezes, se tenha de recorrer ao abate dos mesmos [40]. Estas perdas económicas traduzem-se na diminuição da qualidade de vida das populações, sobretudo nas que vivem em zonas rurais, onde o contacto com animais e o consumo de produtos alimentares de origem animal é mais frequente e menos controlado [89].

A incidência em humanos depende na sua grande maioria da ocorrência de brucelose num reservatório animal, quer doméstico ou selvagem [42]. Por sua vez, a prevalência da doença nas zonas endêmicas depende de vários fatores, tais como hábitos alimentares, métodos de processamento do leite e produtos derivados, práticas pecuárias e higiene ambiental, medidas de prevenção insuficientes e falta de programas de controlo inadequados em alguns países, bem como devido ao transporte não controlado de animais através das fronteiras [45]. O risco ocupacional é também elevado, para profissionais expostos a animais infetados ou aos seus fluidos ou tecidos, como é o caso de veterinários, trabalhadores de matadouros e pecuária ou técnicos de laboratório [34].

Noutros países, devido a conflitos armados e instabilidade política, é muito provável que programas de erradicação anteriormente bem-sucedidos não tenham alcançado efeitos duradouros e a brucelose se tenha tornado um problema novamente [45]. Os fatores socioeconómicos parecem influenciar também a distribuição da doença, quer a nível mundial, quer dentro dos próprios países [76].

Um dos pontos-chave para o controlo da doença em humanos é a erradicação da mesma em reservatórios animais. Outras medidas importantes são os cuidados de higiene, para limitar os riscos de exposição de algumas atividades ocupacionais, e a pasteurização ou fervura dos produtos lácteos e outros alimentos de risco [45].

A maioria dos estudos indica que um dos fatores mais importantes para a prevenção da brucelose animal é o uso de vacinas vivas [57]. A vacinação dos animais elimina, praticamente, todos os sinais clínicos da doença, assim como reduz a probabilidade de que a exposição ao agente infeccioso cause doença em humanos [45]. Atualmente existem três vacinas (*Brucella abortus* S19 e RB51 e *Brucella melitensis* Rev1) recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para uso no controlo da brucelose na pecuária [93, 101].

Ao longo da última década, a epidemiologia global da brucelose humana mudou, em parte, devido à implementação de programas de vigilância nacional e internacional, a campanhas de vacinação animal, e a alterações socioeconómicas [95]. No entanto, enquanto alguns países eliminaram ou reduziram substancialmente a doença, através de programas extensivos de erradicação, esta permanece ainda um problema em várias regiões do mundo [102]. Um controlo adequado da brucelose irá ter,

provavelmente, um maior impacto em populações que dependem da criação de animais para satisfazer as suas necessidades económicas e nutricionais [40].

4. Género *Brucella*

4.1. Características morfológicas

Morfolologicamente, as bactérias do género *Brucella*, são pequenos cocobacillus (0.6-1.5 µm de comprimento e 0.5 a 0.7 µm de largura), são Gram-negativas, aeróbias e não fermentadoras de açúcares [4]. Não possuem cápsula e não são formadoras de esporos [12, 49, 75]. Não têm mobilidade, no entanto possuem todos os genes necessários à montagem de um flagelo funcional, exceto o sistema quimiotático [89]. São intracelulares facultativas, isto é, têm como habitat preferencial o interior das células. Contudo, têm a capacidade de sobreviver no meio ambiente [101, 107]. Possuem uma membrana citoplasmática, constituída por uma bicamada fosfolípídica, na qual se inserem proteínas. Têm também uma parede celular constituída por peptidoglicano e, como é comum a bactérias Gram-negativas, uma membrana externa. Esta membrana encontra-se a revestir a parede celular e é, essencialmente, constituída por fosfolípidos, proteínas e uma molécula anfipática denominada lipopolissacárido (LPS) [9, 37]. O LPS (**figura 2**) localiza-se no folheto externo da membrana externa e é constituído por um Lípido A, através do qual está ancorado à membrana; por um polissacárido O; por uma cadeia lateral, que está em contacto com o espaço extracelular e pelo núcleo ou core de oligossacárido [10].

Este género inclui espécies que podem ocorrer nas formas lisa ou rugosa, dependendo do tipo de lipopolissacárido (LPS) presente na membrana externa. O LPS pode ser liso (S-LPS) (quando contêm a cadeia O lateral) [10] ou rugoso (R-LPS) (quando a cadeia O lateral não está presente) [67]. As estirpes de *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* podem ser lisas (S) ou rugosas (R), expressando lipopolissacáridos lisos (S-LPS), ou lipopolissacáridos rugosos (R-LPS). As estirpes de *B. ovis* e *B. canis* são naturalmente rugosas, expressando assim R-LPS [21]. Relativamente ao aspeto macroscópico das colónias lisas, estas apresentam relevo, são convexas, circulares, translúcidas, e têm entre 0,5 a 1 mm de diâmetro. Por outro lado as colónias rugosas são menos convexas e mais opacas e possuem uma aparência amarelada, granular, amorfa e seca [2].

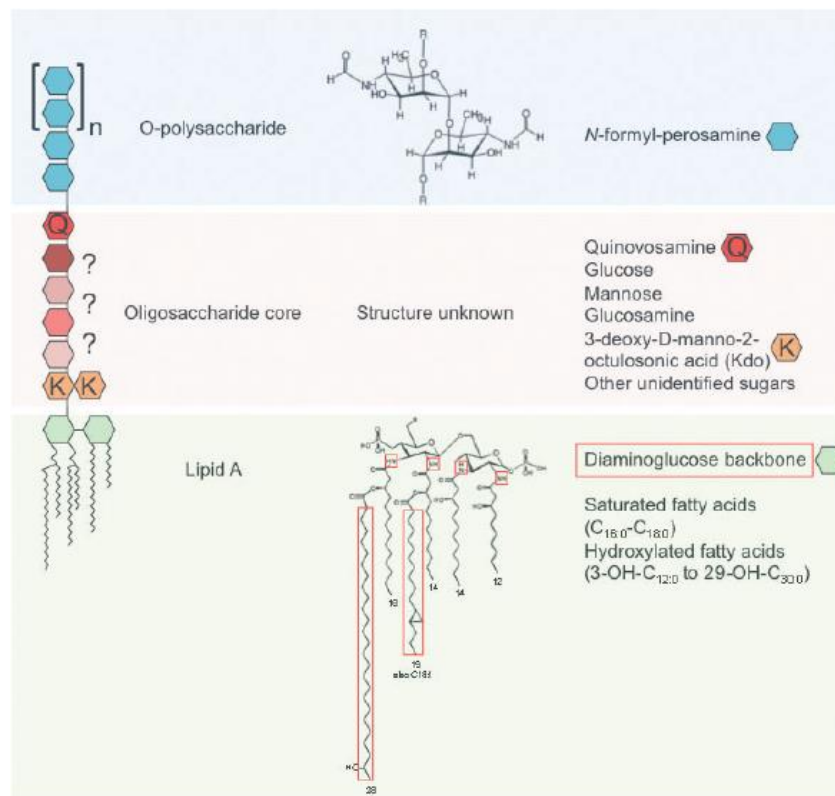


Figura 2. Estrutura do LPS de *Brucella*, constituído pelo Lípid A, core de oligossacárido e o polissacárido O [11].

4.2. Genoma

Apesar das diferenças de virulência e afinidade para o hospedeiro, as espécies de *Brucella* possuem genomas bastante similares, quer em tamanho, quer na composição de bases [8], apresentando uma homologia superior a 90%, demonstrada em ensaios de hibridização DNA-DNA [24].

As espécies pertencentes ao género *Brucella*, já sequenciadas, têm um conteúdo em G+C de aproximadamente 57%. O genoma de *Brucella* é constituído por dois cromossomas circulares com tamanhos de 2.1 Mb e 1.5 Mb. *B. suis* bv 3 é uma exceção, tendo apenas um cromossoma circular com o tamanho de 3.31 Mb [73].

4.3. Taxonomia e Filogenia de *Brucella*

O género *Brucella* pertence à família *Brucellaceae* (família III), ordem *Rhizobiales*, classe *Alphaproteobacteria*, filo *Proteobacteria* [4] juntamente com *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* e *Rickettsia*, com os quais está

proximamente relacionado [12, 82, 89]. As *Alphaproteobacteria* são um grupo diverso de Gram-negativas, a partir das quais evoluíram várias linhagens de bactérias. As famílias de bactérias pertencentes a esta classe ocupam vários nichos no ambiente. Como tal, incluem organismos que podem ser patogênicos para mamíferos, plantas ou simbioses [99].

Estudos moleculares indicam que a maioria das espécies de *Brucella* divergiu de um ancestral comum pertencente à linhagem de *B. ovis* [107], nos últimos 86000-296000 anos. Esta data não é de modo algum próxima da altura de divergência das espécies hospedeiras, o que indica que a divergência de *Brucella* não envolveu coevolução extensiva com os hospedeiros primários, mas reflete a adaptação e preferência por estes hospedeiros [38].

A preferência por hospedeiros, descrita para *Brucella*, não é tão rigorosa como possa parecer. *Brucella* pode infectar animais que não sejam o seu hospedeiro primário, quer seja experimentalmente ou sob condições naturais. Porém, estas infeções parecem ser limitadas. O tamanho, relativamente grande, do genoma de *Brucella* sugere que esta possa existir em ambientes diversificados, mas embora dotada da habilidade de persistir no ambiente, *Brucella* é normalmente encontrada em associação com os seus hospedeiros preferenciais [99]. Esta associação próxima resulta, aparentemente, de mudanças adaptativas ao longo do tempo. Especula-se, com base em comparações com outros organismos proximamente relacionados, que *Brucella* ou o seu antecessor seria um organismo de vida livre que evoluiu para um parasita animal. Enquanto bactérias de vida livre na água e no solo exploram condições diversas e competem com outros organismos nestes ambientes, as bactérias que residem no interior de células hospedeiras encontram menos competição mas estão, no entanto, sujeitas a outros tipos de *stress* [99]. Os passos exatos da adaptação de *Brucella* à vida intracelular são desconhecidos, mas envolvem perda, aquisição e modificação de características genéticas. De acordo com os altos níveis de homologia observados entre as espécies de *Brucella*, parece provável que a radiação do ancestral comum em diferentes espécies, bem como a adaptação a hospedeiros preferenciais, tenha sido rápida e recente em comparação com bactérias relacionadas, como o género *Ochrobactrum*, *Rhizobium* e *Agrobacterium* [38, 98].

A análise das características fenotípicas e variabilidade genética dos membros do género *Brucella* permitiu a construção de árvores filogenéticas, mostrando as relações entre diferentes espécies [98]. A determinação de relações entre as espécies de *Brucella* é essencial para entender a sua ecologia, a sua história evolutiva, as relações com os hospedeiros e para desenvolver métodos de genotipagem precisos [39].

Como se observa na **figura 3**, *B. abortus* e *B. melitensis* são próximas entre si, assim como *B. ovis* e *B. suis* bv 1-4. Sendo *B. suis* bv 5, *B. neotomae*, *B. inopinata* e as estirpes marinhas (*B. ceti* e *B. pinnipedialis*) mais distantes [77].

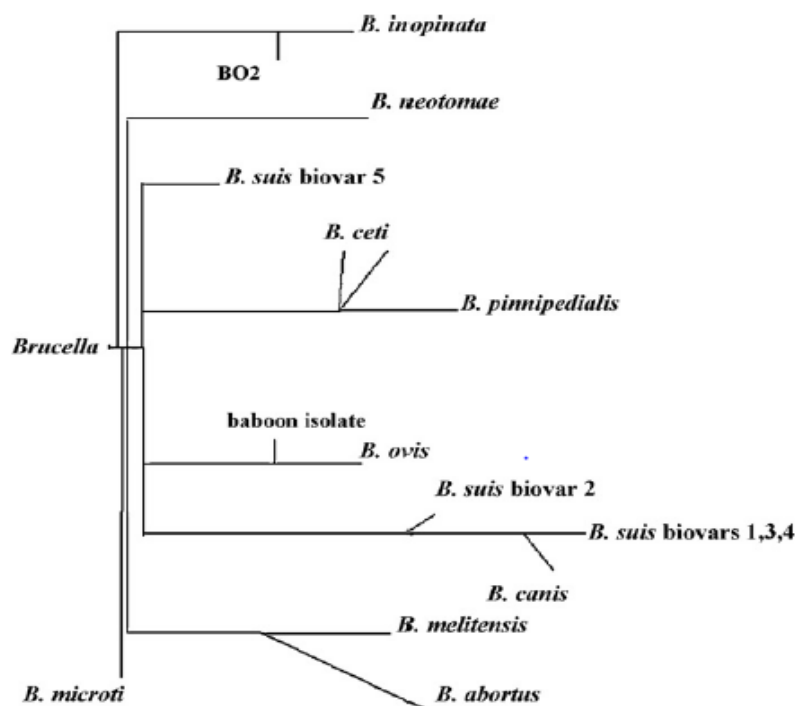


Figura 3. Árvore filogenética representando as relações entre as espécies reconhecidas de *Brucella* [77].

O género *Brucella* (**tabela 1**) é constituído por seis espécies clássicas: *Brucella abortus* biovars 1-6 e 9 (gado), *Brucella canis* (cães), *Brucella melitensis* biovars 1-3 (ovelhas e cabras), *Brucella neotomae* (roedores), *Brucella ovis* (ovelhas) e *Brucella suis* biovars 1-3 (porcos), 4 (renas) e 5 (pequenos roedores) [21, 100]. A estas juntam-se mais 4 novas espécies: *B. ceti*, isolada em golfinhos e baleias, *B. microti*, na ratazana comum [86], raposas vermelhas e solo [85], *B. pinnipedialis* em focas, *B. inopinata* isolada a partir de um implante mamário de uma mulher, e BO2 [87], estirpe semelhante a *B.*

inopinata, isolada do pulmão de um paciente com pneumonia [2, 25, 70, 98, 102]. Mais recentemente, surgiram estirpes isoladas de roedores nativos da Austrália, babuínos e sapos africanos [2, 32]. Estas novas espécies têm vindo a ser isoladas desde o início da década de 90. Tal tem contribuído para o aumento do número de espécies conhecidas, sendo provável que novas espécies venham a ser descobertas futuramente.

Tabela 1. Espécies de *Brucella*, incluindo as novas estirpes, os respetivos hospedeiros e patogenicidade para o Homem [2].

Espécies de <i>Brucella</i>	Biovars	Hospedeiro Animal	Doença no Homem
<i>B. abortus</i>	1 - 6, 9	Gado, bisonte, búfalo, alce, iaque, camelo	Sim
<i>B. melitensis</i>	1 – 3	Ovelha, cabra, vaca, camelo	Sim
	3	Peixe-gato do nilo, cão	
	1	Cavalo	Sim (bvs 1, 3, 4)
<i>B. suis</i>	1 – 3	Porco, javali	
	2	Lebre comum	
	4	Caribou, rena	
	5	Roedores	
<i>B. canis</i>		Canídeos	Sim (raramente)
<i>B. ovis</i>		Ovino	Não reportado
<i>B. neotomae</i>		Roedores	Não reportado
<i>B. ceti</i>		Baleia, golfinho, boto	Sim
<i>B. pinnipedialis</i>		Foca, leão marinho	Não reportado
<i>B. microti</i>		Ratazana, raposa, (solo)	Não reportado
<i>B. inopinata</i>		Desconhecido	Sim
Isolados de babuínos		Babuínos	Não reportado
BO2		Desconhecido	Sim
Isolados de roedores		Roedores	Não reportado
Isolados de Rã		Rã-touro africana	Não reportado

BO: *B. inopinata*-like strain

bvs: biovars

A classificação tradicional das espécies de *Brucella* baseia-se sobretudo em diferenças nas características morfológicas, de patogenicidade e preferência de hospedeiro [95]. Contudo, com base no elevado grau de homologia entre as espécies de *Brucella*, em 1985 foi proposto que as espécies de *Brucella* fossem agrupadas como *biovars* de uma única espécie [21]. Esta nova designação não foi recebida com entusiasmo pela comunidade científica. Devido, quer à preocupação dos laboratórios clínicos e veterinários, habituados às designações originais para propósitos epidemiológicos, quer à vontade de evitar confusão entre os investigadores no que diz respeito à origem e perigo associado a alguns agentes em particular. Por esta razão, o retorno à nomenclatura original foi acordada pelo Subcomité Taxonómico de *Brucella* [38]. A análise molecular veio demonstrar a existência de diferenças genómicas entre as espécies e *biovars* de *Brucella*, consistentes com a utilização de critérios como as

características fenotípicas, metabólicas, de patogenicidade e preferência de hospedeiro. A demonstração de que estes critérios são válidos para a classificação dos membros do género *Brucella* [90], veio apoiar deste modo a divisão tradicional das espécies de *Brucella* e o retorno à taxonomia anterior [10, 41, 72, 107].

5. Brucelose Humana

5.1. Transmissão

Quatro das espécies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis*) são patogénicas para o homem, sendo *B. melitensis* (mais de 90% dos casos) a espécie mais virulenta e mais prevalente em todo o Mundo [60, 66, 75, 90].

Esta bactéria pode entrar no organismo humano por inalação, ingestão, através da conjuntiva ou por ferimentos na pele [40] e é transmitida através do contacto direto ou indireto com animais, consumo de laticínios não pasteurizados, carne mal cozinhada e por exposição ocupacional [45, 76, 96]. A transmissão entre humanos é muito rara [4, 81, 89].

Tem sido referido que espécies de *Brucella* associadas a animais marinhos podem causar doença em humanos [4], bem como as vacinas de animais, *B. melitensis* Rev.1 e 19 *B. abortus* [89].

No que diz respeito à brucelose ocupacional, esta pode ser dividida em duas categorias. A primeira inclui as infeções adquiridas em matadouros e talhos, pelo manuseamento de carne, na indústria do leite e seus derivados e no contacto direto com animais. Veterinários, tratadores de animais, talhantes, trabalhadores de matadouros formam um grupo de risco [8, 4]. A segunda categoria inclui as infeções adquiridas em laboratórios clínicos e de investigação, com os microbiólogos e os técnicos de laboratório no grupo de maior risco [8, 12, 29]. As infeções adquiridas em laboratório representam 2% de todos os casos mundiais [12, 81].

5.2. Sintomas

No homem caracteriza-se por ser uma doença com sintomas inespecíficos que, apesar de raramente ser fatal, pode ser severamente debilitante e incapacitante [40, 100]. É uma doença sistémica, que pode comprometer qualquer órgão ou sistema do corpo

humano, e tem um largo espectro de manifestações clínicas. Pode progredir para a cronicidade e caracteriza-se muitas vezes pela ocorrência de recaídas e reincidência [12, 84]. Os doentes podem apresentar quadros clínicos muito diversos, consoante espécie de *Brucella* em causa, modo de transmissão, resposta do hospedeiro, fase da doença e órgãos afetados, dificultando assim o diagnóstico [29, 42, 103].

O período de incubação da doença é variável, sendo normalmente de 1-4 semanas, mas pode demorar meses até que apareçam sinais de infeção [89]. Consoante a duração dos sintomas, pode ser classificada como aguda (primeiros dois meses), subaguda (2-12 meses) e crónica (duração superior a dois meses) [40]. A infeção pode ser assintomática ou sintomática, sendo os sintomas mais comuns, febre, suor, fadiga, indisposição, anorexia, cefaleia, artralgia, perda de peso, mialgias [29, 83]. Os sintomas pouco específicos podem levar a que esta seja confundida com outras doenças, entre as quais a tuberculose, malária, febre tifoide, endocardite infecciosa, leptospirose, mononucleose infecciosa, febre reumática, síndrome de fadiga crónica, doenças autoimunes e tumores [4, 89].

As manifestações clínicas, mais comuns, observadas no homem são complicações osteoarticulares, que produzem lesões focalizadas nos ossos e articulações (10-70%), complicações genitais, quer em homens (6-8%) e mulheres (2-5%), neurológicas (3-5%), cardíacas (1-3%), respiratórias (1-2%) e renais (<1%) [4, 100].

A mortalidade é muito baixa (<1%), estando associada ao diagnóstico e terapia tardios. Resulta sobretudo de complicações cardíacas [4, 91] ou quando o sistema nervoso é atingido [22].

5.3. Terapêutica

Sendo *Brucella* um microrganismo intracelular facultativo, existe um número limitado de antibióticos eficazes contra este microrganismo. Assim, o tratamento eficaz requer, não só uma combinação de antibióticos, mas também agentes que consigam penetrar com eficiência os macrófagos [4, 12, 54]. A escolha do regime e duração terapêuticos depende de vários fatores, nomeadamente a fase em que se encontra a doença, a gravidade do quadro clínico, idade do doente e gravidez [4].

Em 1986, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou recomendações para a

utilização de doxiciclina, combinada com rifampicina ou estreptomicina no tratamento de brucelose humana [74, 84]. A maioria dos indivíduos com doença aguda responde bem ao esquema terapêutico recomendado pela OMS. Pacientes com doença focalizada podem necessitar de terapias com maior duração, dependendo da sua evolução clínica. A doxiciclina e estreptomicina devem ser evitadas durante a gravidez, recomendando-se a administração de rifampicina em regime de monoterapia ou rifampicina juntamente com TMP-SMZ (trimetoprim-sulfametoxazole). Em crianças com idade inferior a 8 anos, o uso de doxiciclina é desaconselhado, podendo-se utilizar como alternativa TMP-SMZ juntamente com gentamicina, ou rifampicina [91].

A tigeciclina, um novo membro da família das tetraciclina, é um antibiótico de largo espectro de ação e demonstra uma excelente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [7].

Apesar do esquema terapêutico recomendado pela OMS ser, geralmente, bem-sucedido, existem registos de alguns casos de falências terapêuticas, que levam a novos estudos para se conseguir obter outros esquemas terapêuticos [74, 76].

5.4. Diagnóstico

O diagnóstico de um doente com brucelose requer a combinação de várias abordagens, incluindo o historial clínico, examinação clínica, testes hematológicos e bioquímicos, investigação radiológica e, sobretudo, testes de diagnóstico laboratorial, que podem ser baseados em métodos diretos como o isolamento do agente (cultura), e a deteção de ácidos nucleicos (métodos moleculares) ou em métodos indiretos, que se baseiam na análise da resposta imunológica do doente (testes serológicos) [4]. Idealmente, os testes de diagnóstico devem ser rápidos, específicos e com elevada sensibilidade [12].

5.4.1. Cultura

O isolamento do agente etiológico a partir de hemocultura constitui o método de diagnóstico de referência. *Brucella* spp. também pode ser isolada a partir de outras amostras biológicas: medula óssea, nódulos linfáticos, amostras de tecidos, fluidos cerebrospinais, pleurais, articulares e ascíticos [40]. No entanto, este não é um

método de rastreio prático, uma vez que exige períodos de incubação da cultura, relativamente longos e, devido à classificação de *Brucella* como agente de risco biológico, tem que ser realizado em laboratórios de Biossegurança de nível 3 [108].

5.4.2. Testes serológicos

Os testes serológicos de aglutinação baseiam-se na reação entre os anticorpos e o LPS, que é o antigénio determinante neste tipo de testes. Contudo, as cadeias laterais O-específicas da molécula de LPS são consideradas responsáveis pela ocorrência de reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas (*Yersinia enterocolitica*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Stenotrophonas maltophilia* e *Vibrio cholerae*), nos testes de aglutinação, dificultando assim o diagnóstico [4, 33].

Um dos testes realizados com mais frequência é o **Teste de Rosa Bengala**, uma reação de aglutinação em que o antigénio é corado com rosa bengala. É um método de rastreio rápido (5-10 min) e produz resultados relativamente fiáveis em doentes na fase aguda da doença, mas apresenta elevados resultados falsos negativos em casos crónicos, devendo, por isso ser confirmado por outros testes [92].

O **Teste de Aglutinação Sérica** (Reação de Wright), IgG e IgM, é considerado o método de referência para o diagnóstico serológico de brucelose humana. No entanto, é um teste demorado e apresenta resultados ambíguos na fase crónica da doença [92].

A **Reação de Coombs** permite a deteção de anticorpos IgG e IgA não aglutinantes anti-*Brucella*, e pode ser utilizado como complemento da Reação de Wright, sendo muito sensível em casos de cronicidade e recaídas.

A **Reação de Imunocaptura** é um método alternativo da Reação de Wright ou da reação de Coombs, que deteta anticorpos totais e apresenta bons resultados independentemente da fase da infeção.

Outros métodos, menos utilizados, são o Teste de Microaglutinação, Imunofluorescência Indireta e Teste de Fixação do Complemento [2, 92].

A **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica utilizada em casos complicados, crónicos ou focalizados, deteta imunoglobulinas específicas e totais (IgG, IgM, IgA), é rápida (4-6h) com alta sensibilidade e especificidade [92].

Estes métodos serológicos têm limitações importantes. Para além da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, demonstram também pouca sensibilidade nos estágios iniciais da doença, durante os quais os níveis de anticorpos permanecem baixos. Também em áreas endémicas, onde uma parte significativa da população pode apresentar resultados serológicos positivos, sem evidência de doença. Estes métodos têm também um valor limitado no diagnóstico de indivíduos que já foram tratados para brucelose e são suspeitos de recaída [2, 71].

5.4.3. Técnicas Moleculares

O PCR é um método mais rápido e sensível que os métodos serológicos. Têm sido desenvolvidas inúmeras técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (RT-PCR) para a deteção direta de *Brucella* em amostras clínicas, para monitorizar a resposta ao tratamento e para identificação e diferenciação das estirpes isoladas. A maioria das técnicas desenvolvidas utilizam *primers* que têm como alvo sequências do RNA 16S e genes de diferentes proteínas da membrana externa [92]. O PCR pode ser utilizado para detetar DNA de *Brucella* em culturas puras ou tecidos e fluidos biológicos e, independentemente do estágio da infeção, é mais específico que as hemoculturas e que os testes serológicos [2].

Uma das primeiras técnicas de PCR desenvolvidas para diagnóstico foi o AMOS PCR (*Abortus–Melitensis–Ovis–Suis*), que utiliza um *primer* comum que tem como alvo um elemento de inserção (IS711), e quatro *primers* diferentes, específicos para cada uma das quatro espécies referidas, que são diferenciadas com base no tamanho dos fragmentos obtidos. Posteriormente foi desenvolvido o *Bruce-ladder*, que permite diferenciar entre todas as estirpes de *Brucella*, incluído as isoladas de mamíferos marinhos [2, 12, 40, 88]. O RT-PCR apresenta maior potencial para uma identificação direta e rápida [2, 109].

6. Virulência

A investigação genómica mostra que as espécies de *Brucella* não apresentam fatores de virulência típicos. Sendo intracelular facultativa, um aspeto chave da virulência de *Brucella* é a capacidade de penetrar, sobreviver e de se multiplicar no interior das células do hospedeiro [7, 8]. As bactérias do género *Brucella* têm a capacidade de infectar células fagocíticas e não fagocíticas, sendo os macrófagos, células dendríticas e trofoblastos os principais alvos [11, 58]. Durante o processo infeccioso, as bactérias atravessam a mucosa e contactam com as células do hospedeiro, desencadeando a ativação da imunidade inata do hospedeiro, mediada por fagócitos e células NK (*Natural Killer*). Os macrófagos são recrutados e fagocitam os microrganismos, que são incorporados num vacúolo designado de BCV (*Brucella Containing Vacuole*). A maioria dos BVCs sofre modificações associadas ao processo de maturação dos fagossomas e interagem com a via endocítica, acabando por se fundir com lisossomas [11]. Após a fusão ocorre acidificação, formação de mediadores de morte celular e ativação das enzimas hidrolíticas do lisossoma, promovendo-se o processo de destruição dos microrganismos e sua eliminação através de exocitose. Cerca de 90% das bactérias são eliminadas neste processo [5, 11]. As bactérias que sobrevivem têm a capacidade de escapar às respostas da imunidade inata do hospedeiro, criando um novo ambiente intracelular, no qual conseguem sobreviver e multiplicar-se [40, 78]. *Brucella* expressa fatores de virulência que modificam o processo de maturação e controlam a interação dos BCVs com a via endocítica, de modo a evitar a maturação do fagossoma e consequente fusão com o lisossoma. As bactérias interferem com as funções do macrófago, inibindo a expressão do TNF- α e do IFN- γ , interrompendo o efeito bactericida das células *Natural-Killer* (NK) e dos macrófagos [75]. Os BCVs são submetidos a interações extensivas com a via secretória, antes de se fundirem, por fim, com o retículo endoplasmático (RE).

Uma vez no RE, os BCVs derivados do RE proporcionam o ambiente ideal para a persistência intracelular e replicação de *Brucella*, sem que seja comprometida a integridade celular do hospedeiro. Após a fase de replicação, as bactérias são libertadas para infectar as células adjacentes, sendo induzida a necrose celular [11, 58].

6.1. Fatores de Virulência

As espécies de *Brucella* não apresentam fatores de virulência clássicos. A estratégia das bactérias do gênero *Brucella* passa pelo desenvolvimento de mecanismos que lhe permitam sobreviver o tempo necessário para a sua replicação no interior do hospedeiro [26].

O S-LPS e as proteínas envolvidas na sinalização, regulação dos genes, transporte transmembranar encontram-se entre os fatores que se pensa estarem envolvidos na virulência de *Brucella* [40].

6.1.1. LPS

O LPS é o maior componente da superfície de *Brucella*, constituindo um dos fatores de virulência mais importante de *Brucella*. Desempenha um papel importante na invasão da célula hospedeira e na sobrevivência intracelular [29], devido a propriedades que incluem uma baixa endotoxicidade, elevada resistência à degradação pelos macrófagos e a proteção que confere contra as respostas imunitárias [59]. A cadeia lateral O medeia a interação com recetores específicos na superfície celular, traduzindo-se num fator importante para os eventos de maturação do BCV prematuro [11]. O S-LPS reduz a capacidade do macrófago infetado apresentar antígenos externos ao MHC de classe II e subsequentemente a ativação das células T, prevenindo o ataque e eliminação das células infetadas pelo sistema imunitário do hospedeiro [11]. O LPS está também envolvido na inibição da apoptose das células infetadas [16, 40, 92], uma vez que é um fraco indutor do IFN- γ (indutor da morte celular programada) e do TNF- α (fator de necrose tumoral) [18, 106]. As estirpes rugosas, em que o LPS não tem a cadeia lateral O, são menos virulentas, pois não demonstram capacidade de ultrapassar o sistema imunitário do hospedeiro [11].

6.1.2. BvrR/BvrS

Outro dos fatores envolvidos na virulência de *Brucella* é o sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS que atua, através de uma cascata de fosforilação de proteínas, no controlo da expressão de várias proteínas da membrana externa. Entre as proteínas reguladas por BvrR/BvrS estão Omp25 e Omp22, que estão envolvidas na

ligação e invasão celulares [12, 29, 40, 92]. Este sistema consegue detetar alterações nas condições do ambiente intracelular. Quando há diminuição do pH do meio, após a captação das bactérias pelos macrófagos, esta é sentida pelo sistema BvrR/BvrS, que, por sua vez, vai induzir outro sistema importante na virulência de *Brucella*, designado VirB, através da ativação do fator de transcrição VjbR [62].

6.1.3. Sistemas de Secreção Tipo IV (VirB)

Nas bactérias patogénicas, os sistemas de secreção estão usualmente envolvidos em interações microrganismo-hospedeiro, tendo como principal papel o envio de proteínas efetoras ou outras macromoléculas diretamente para o citoplasma da célula hospedeira, auxiliando o processo de colonização e sobrevivência no interior das células ou tecidos [3, 19].

Os Sistemas de Secreção Tipo IV são complexos multiproteicos, presentes nas bactérias. Nas bactérias Gram-negativas patogénicas, estes sistemas são especializados pela libertação de proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras, contribuindo para a colonização e sobrevivência no interior do hospedeiro. Estes substratos proteicos do T4SS são responsáveis pela modulação de diversos processos celulares, incluindo a apoptose, tráfego vesicular e ubiquitinação [64].

Em *Brucella* o sistema de secreção tipo IV (T4SS) é um complexo de 12 proteínas codificado pelo operão *VirB*. O T4SS abrange ambas as membranas de *Brucella* e é responsável pelo transporte seletivo de proteínas efetoras, através da membrana do BCV para o citoplasma da célula hospedeira [26, 58].

Este sistema é essencial para a patogenicidade de *Brucella*, uma vez que desempenha um papel crucial na criação de um novo ambiente, favorável à replicação de *Brucella*.

No interior da célula, após a acidificação, a indução pelo sistema BvrR/BvrS estimula o aumento da síntese de proteínas VirB, que atuam na neutralização do pH [40, 58, 92, 99]. Quando o compartimento de replicação intracelular está estabelecido e a replicação tem início, o operão *VirB* é reprimido [58]. Este sistema é necessário apenas durante pequenos períodos na infeção intracelular, sendo particularmente importante na fase inicial da infeção, uma vez que tem a capacidade de afetar as propriedades da

membrana externa, de regular o tráfego do BCV e a sua interação com o retículo endoplasmático, e de controlar as respostas imunes do hospedeiro [12, 58].

6.2. Efetores Bacterianos

São proteínas secretadas por bactérias patogênicas no interior das células do hospedeiro, utilizando normalmente um sistema de secreção. As proteínas efetoras podem ter inúmeras atividades distintas, mas, em geral, auxiliam a bactéria na invasão ao hospedeiro, suprimindo o seu sistema imunitário, permitindo a sobrevivência da bactéria no interior da célula hospedeira. Os efetores são elementos importantes do T4SS para a sobrevivência intracelular de *Brucella*. Apesar do VirB T4SS ter sido descoberto há mais de 10 anos, ainda foram identificadas e caracterizadas poucas potenciais proteínas efetoras. Como tal pouco se conhece sobre a função das mesmas e acerca dos mecanismos que estas utilizam para modular o tráfego intracelular das bactérias patogênicas [11, 30].

Neste trabalho serão estudados três genes que codificam para potenciais proteínas efetoras. São eles BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533 e foram identificados no cromossoma I de *Brucella melitensis* bv *Abortus 2308* [11]. O genoma desta estirpe consiste em dois cromossomas circulares ChrI (2,121,359 pb) e ChrII (1,156,950 pb), codificando para 2,280 e 1,214 ORFs (*Open Reading Frames*), respetivamente [73].

6.2.1. BAB1_0296

BAB1_0296 (*Brucella melitensis* bv *Abortus 2308*) é um gene que contém uma ORF (*Open Reading Frame*). Está localizado no cromossoma I de *Brucella*, tem um tamanho de 390 pb e codifica para uma hipotética proteína efetora de 129 aminoácidos e 14.542 kD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3787078>).

6.2.2. BAB1_1101

BAB1_1101 (*Brucella melitensis* bv *Abortus 2308*) é um gene que contém uma ORF e está localizado no cromossoma I de *Brucella*. Tem um tamanho de 405 pb e codifica para uma hipotética proteína efetora de 134 aminoácidos e 15.038 kD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3787753>).

6.2.3. BAB1_1533

BAB1_1533 (*Brucella melitensis* bv *Abortus 2308*) é um gene que contém uma ORF e está localizado no cromossoma I de *Brucella*. Tem um tamanho de 513 pb e codifica para uma glutelina (região rica em prolina), constituída por 170 aminoácidos e 18.831 kD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3788073>).

7. Métodos de Tipagem e Caracterização de Estirpes de *Brucella*

As técnicas moleculares, para além da importância que têm no diagnóstico, são úteis na tipagem e caracterização moleculares de *Brucella*, podendo ser utilizadas em estudos de diversidade genética, num contexto evolutivo, ou na vigilância epidemiológica e investigação em regiões com elevada incidência de brucelose [29, 35]. Contudo, a discriminação entre espécies de *Brucella* revela-se uma tarefa complicada, uma vez que o género *Brucella* é geneticamente conservado, sendo a homologia existente entre as espécies de *Brucella* superior a 90% [40, 45, 60].

A possibilidade de sequenciação de genomas completos permite desenvolver novas técnicas de tipagem molecular, como é o caso do MLST (*Multilocus Sequence Typing*), análise de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*), que têm elevada capacidade discriminatória, possibilitando a identificação ao nível da espécie, *biovar* e até de estirpe [51, 88, 101]. Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas várias metodologias moleculares para a análise e tipagem das diferentes estirpes de *Brucella* spp.

7.1. Polimerase Chain Reaction (PCR)

O PCR é uma reação que permite a amplificação exponencial de quantidades mínimas de DNA, permitindo a síntese de uma quantidade de produto detetável. Esta reação necessita da sequência de DNA que se quer amplificar, de um par de *primers*, de nucleótidos e de uma enzima para síntese de DNA. Esta enzima deve ser resistente ao calor de modo a resistir às altas temperaturas utilizadas durante cada ciclo de PCR para desnaturar o DNA. Os *primers* são sintetizados de forma a serem complementares às extremidades 3' do segmento de DNA molde, flanqueando-o [97]. Uma reação de PCR

consiste numa série de ciclos, cada um dos quais envolve reações efetuadas a temperaturas diferentes. Cada ciclo de PCR envolve desnaturação de DNA, hibridação dos *primers* e síntese de DNA. Numa reação típica de PCR, a desnaturação consiste na incubação do DNA a uma temperatura de 95°C para separar a cadeia dupla em cadeias simples. Segue-se a hibridação dos *primers*, diminuindo gradualmente a temperatura para cerca de 55°C. Esta temperatura varia, dependendo da composição do *primer* e da sua complementaridade com o DNA alvo. Durante este passo, as duas cadeias complementares do DNA alvo permanecem desnaturadas porque estão em baixa concentração e não emparelham. Os *primers* vão emparelhar com as cadeias de DNA alvo, pois estão presentes numa concentração muito alta. Finalmente, para completar o ciclo, é feita a síntese de DNA pela *Taq* polimerase a uma temperatura de 72°C. Esta enzima faz a elongação dos *primers*, usando como molde a cadeia a que cada *primer* está emparelhado. O ciclo de desnaturação (95°C), hibridação (55°C) e extensão (72°C) é repetido várias vezes no termociclador, sem intervenção manual. Cada ciclo demora apenas alguns minutos e, por isso, todo o processo é muito rápido. O resultado é a grande amplificação das sequências de DNA delimitadas pelos dois *primers* usados na reação. Durante cada ciclo posterior de PCR, estas moléculas são duplicadas levando a uma amplificação exponencial do DNA. Cada n ciclos leva à produção de 2^n moléculas de DNA. Esta quantidade é suficiente para que o DNA possa ser diretamente visualizado num gel de agarose, sem recurso a técnicas de marcação radioativa [97].

7.2. Eletroforese em Gel de Agarose

A análise dos produtos resultantes da reação de PCR é feita por eletroforese em gel de agarose. A separação por eletroforese permite estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos, DNA ou RNA. A eletroforese de DNA é feita normalmente em gel de agarose, que se prepara dissolvendo uma suspensão de agarose numa solução tampão, deixando solidificar num recipiente apropriado [97]. Colocando previamente um “pente”, obtém-se um gel contendo uma fileira de poços numa das extremidades, em que, posteriormente serão colocadas as amostras a analisar. O gel é colocado numa tina de eletroforese, imerso em tampão, ficando entre dois elétrodos posicionados paralelamente à fileira de poços do gel. As amostras de DNA são colocadas nos poços do gel e, com a aplicação de um campo elétrico, vão migrar para o

polo positivo (ânodo), uma vez que os ácidos nucleicos têm carga negativa e pH neutro. A agarose atua como uma rede, deixando passar mais facilmente as moléculas mais pequenas que, assim, vão migrar mais do que as moléculas maiores. As moléculas do mesmo tamanho migram conjuntamente e formam bandas. Assim, é possível estimar o tamanho de fragmentos de DNA comparando a sua migração em gel com a migração de fragmentos cujo tamanho é conhecido [97].

7.3. Sequenciação de DNA

A determinação da sequência de nucleótidos que compõem um fragmento de DNA clonado representa um dos processos finais na análise de DNA. O método laboratorial mais comum de sequenciação de DNA é conhecido como o método de Sanger ou método de terminação de cadeias. Este método é uma reação enzimática que envolve a síntese de novo de uma série de cadeias simples de DNA, usando como molde a cadeia de DNA que se quer sequenciar, através da ação de uma DNA polimerase. As cadeias sintetizadas são terminadas prematuramente nos vários tamanhos possíveis. A síntese começa sempre num ponto definido (por um *primer*) e termina por incorporação de nucleótidos terminadores. Estes são derivados didesoxi dos nucleótidos normais que, não possuindo um grupo hidroxilo na posição 3' da desoxirribose, impedem as ligações fosfodiéstericas do DNA. Consequentemente, termina a incorporação de nucleótidos à cadeia de DNA que está a ser sintetizada. Os quatro terminadores são abreviadamente designados por ddA, ddC, ddG e ddT. Cada terminador é marcado com um fluorocromo diferente. As diferentes fluorescências são detetadas num aparelho designado de Sequenciador Automático, permitindo assim a leitura das sequências [97].

7.4. *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)*

O MLVA é um ensaio que utiliza marcadores moleculares altamente discriminatórios designados por repetições em tandem de sequências em número variável (VNTRs – *Variable Number Tandem Repeats*), compostos por cópias perfeitas ou imperfeitas de uma unidade elementar, existentes no genoma bacteriano [1, 97]. Este ensaio permite a caracterização de estirpes tendo em conta a variação do número de repetições em

tandem (VNTRs) num determinado locus [24]. Os VNTRs podem ser classificados em minissatélites, com unidades de repetição superior a 9 pares de bases; microssatélites, com unidades de repetição entre 2 a 8 pares de bases e repetições de base única (SNR).

A análise por MVLA tem sido utilizada com sucesso na identificação e genotipagem de *Brucella*, pois consegue distinguir isolados de *Brucella* de origens muito próximas. Permite determinar relações entre isolados de *Brucella* de diferentes espécies de animais e humanos, e é também uma ferramenta bastante útil em estudos epidemiológicos, uma vez que permite estudar a dispersão temporal e origens geográficas de *Brucella* [27, 70, 95]. O MLVA é também eficiente na confirmação laboratorial de infeções, caracterização de surtos, identificação de diferentes genótipos com variados potenciais patogénicos e avaliação da estabilidade entre lotes de vacinas [24].

Neste estudo foi realizado o MLVA16, em que são utilizados 16 *loci* agrupados em 3 painéis: painel 1 (8 *loci* constituídos por minissatélites), painel 2A (3 *loci* constituídos por microssatélites) e painel 2B (5 *loci* constituídos por microssatélites). O painel 1 é útil para a identificação e diferenciação ao nível da espécie, enquanto o painel 2A e o painel 2B aumentam o poder discriminatório, permitindo a diferenciação ao nível da estirpe [24, 63]. A amplificação dos 16 *loci* selecionados, é efetuada por PCR, para cada estirpe de *Brucella* que se quer estudar. A análise dos produtos de PCR é feita por eletroforese em gel de agarose a 3%, de modo a determinar o tamanho de fragmentos de DNA amplificados por PCR que contêm regiões VNTR de interesse, possibilitando a estimativa do número de cópias de cada repetição que corresponde a uma variante alélica. Esta correspondência faz-se recorrendo à tabela representada no **Anexo III** [61].

8. Objetivos

A realização do presente trabalho tem dois objetivos fulcrais. O primeiro é a caracterização de genes que codificam potenciais proteínas efetoras, que se pensa estarem envolvidas nos mecanismos de virulência de *Brucella*. O segundo é a tipagem molecular de diferentes estirpes de *Brucella* através da análise de VNTRs.

Primeiramente, será feita a sequenciação dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533 em diferentes estirpes de *Brucella*, pertencentes à coleção do INSA, de modo a:

- Investigar a diversidade genética dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533 nas diferentes estirpes de *Brucella*.
- Avaliar e caracterizar os parâmetros evolutivos destes genes nas diferentes estirpes.
- Estudo das relações filogenéticas entre os genes das diferentes estirpes.

A segunda parte deste trabalho será realizada utilizando a técnica MLVA16 nas diferentes estirpes de *Brucella*, pertencentes à coleção do INSA, permitindo a:

- Caracterização e tipagem molecular de estirpes de *Brucella*.
- Avaliação do poder discriminatório da utilização dos 16 *loci* na diferenciação entre estirpes de *Brucella*.
- Procura de relações filogenéticas entre as estirpes, tendo em consideração a espécie a que pertencem, origem geográfica e hospedeiro.

Este estudo é relevante na medida em que o conhecimento dos genes codificantes de proteínas efectoras pode servir de base para novos estudos de caracterização destas proteínas e suas funções, conduzindo a uma melhor compreensão do papel das mesmas nos mecanismos de virulência de *Brucella*.

A tipagem molecular de novas estirpes, utilizando a técnica MLVA16 permitirá aumentar o número de estirpes caracterizadas na base de dados MLVAbank (<http://mlva.u-psud.fr/>), que podem servir de base a outros trabalhos, nomeadamente estudos epidemiológicos.

O conhecimento mais profundo do género *Brucella* é, assim, relevante na área da Saúde Pública, não só em Portugal, mas também nos outros países onde a doença é endémica.

II. Material e Métodos

1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533

1.1. Cultura de estirpes de *Brucella*

As estirpes de *Brucella* utilizadas no estudo dos efetores BAB1 encontram-se descritas na **Tabela 2**, e pertencem à coleção de estirpes da Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação (UREB) do Departamento de Doenças Infeciosas (DDI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge obtidas. Uma foram obtidas através da rede de vigilância epidemiológica de *Brucella*, outras cedidas pelo Instituto Salud Carlos III em Madrid, e pelo repositório de estirpes do projeto *Quandhip (Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens)*. As estirpes, guardadas em suspensão em tubos de meio TSB com 5% de glicerol, no ultracongelador a -80°C, foram descongeladas para gelose de Sangue e incubadas a 37°C em atmosfera de aerobiose durante 48 horas, uma vez que *Brucella* é um microrganismo de crescimento fastidioso [35].

Tabela 2. Estirpes de *Brucella* utilizadas no estudo dos efetores BAB1.

<i>Estirpe</i>	<i>Origem</i>	<i>Local</i>	<i>Espécie</i>	<i>Ano</i>
2308	Referência	-	<i>B. melitensis</i> bv <i>Abortus</i>	-
43B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
44B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
66B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
35B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
38B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
167B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
165B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
36B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
168B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
40B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
169B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
41B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
1B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2010
166B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
147B	Homem	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2013
20Bm3	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2002
47Bm3	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2001
357Bm3	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2004
463Bm3	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2005
804Bm3	Bovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2008
770Bm1	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
918Bm3	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2011

782Bm1	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
825Bm1	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2008
668Bm1	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
256Ba3	Bovino	Portugal	<i>B. abortus</i>	2005
4Bs2	Suíno	Portugal	<i>B. suis</i>	2000
27Bs2	Suíno	Portugal	<i>B. suis</i>	2003
115Bs2	Javali	Portugal	<i>B. suis</i>	2008
194Bs2	Suíno	Portugal	<i>B. suis</i>	2011
120/99E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	1999
167/00E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2000
194/00E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2000
457/06E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2006
204/01E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2001
213/03E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2003
228/03E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2003
170/04E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2004
238/04E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2004
297/04E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2004
723/07E	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2007
146-10	Homem	Espanha	<i>B. abortus</i> 159094	-
146-11	Homem	Espanha	<i>B. abortus</i> 159095	-
146-12	Homem	Espanha	<i>B. melitensis</i> 159096	-
104-11	Homem	Alemanha	<i>B. melitensis</i>	-
104-12	Homem	Alemanha	<i>B. melitensis</i>	1997
104-13	Homem	Alemanha	<i>B. melitensis</i>	2009
148-9	Homem	Bélgica	<i>B. melitensis</i> AF 166/96	1992
183-4	Desconhecida	Hungria	<i>B. melitensis</i> strains foster	1952
183-6	Desconhecida	Hungria	<i>B. suis</i> strain Paris	1952
183-7	Desconhecida	Hungria	<i>B. ovis</i> CNCTC 6741	2009

1.2. Extração de DNA

Na extração de DNA de *Brucella* utilizou-se o *kit* de extração *QIAamp® DNA Mini Kit* (*Qiagen*). A extração foi realizada a partir da cultura de uma placa de meio gelose de Sangue. As células foram ressuspensas em 180 µL de tampão ATL, ao qual se adicionou de seguida 20 µL de proteinase K, ambos fornecidos no *kit*, e incubadas a 56°C, numa placa de aquecimento, até lise completa. Depois adicionou-se 200µL de tampão AL, também fornecido no *kit*, homogeneizou-se no vórtex e deixou-se a incubar a 70°C, durante 10 minutos. Adicionaram-se 200µL de etanol absoluto e homogeneizou-se no vórtex, transferindo-se a solução para uma coluna *QIAamp Mini* com um tubo coletor de 2ml e centrifugou-se durante 1 minuto a 8000 rpm. Rejeitou-se o tubo coletor com o eluído e colocou-se a coluna num novo tubo coletor à qual se adicionou 500 µL de tampão AW1, centrifugando-se novamente 1 minuto a 8000 rpm. A coluna foi colocada num novo tubo coletor à qual se adicionou 500 µL de tampão

AW2, centrifugando-se durante 3 minutos a 14000 rpm. Rejeitou-se o tubo coletor, passando novamente a coluna para um novo tubo e adicionou-se 100µL de tampão AE, deixando-se incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugou-se durante 1 minuto a 8000 rpm, de modo a recuperar o DNA no tubo coletor e guardou-se o DNA extraído a -20°C.

1.3. Amplificação dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533

Na reação de PCR realizada neste estudo amplificaram-se 3 genes diferentes: BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533, utilizando-se o *kit da Bio-X-Act Short® (Bioline)*, contendo: tampão 10x *OptiBuffer*, solução MgCl₂ 50mM e enzima *Bio-X-Act Short DNA polymerase*. A mistura de reação continha 11.5µL de água, 2.5µL de tampão, 1.4µL de MgCl₂, 0.4µL de enzima, 5µL de dNTPs 200µM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1.25µL de cada *primer* específico, para a amplificação de cada um dos genes, em ambas as direções *forward* e *reverse*. Os *primers* utilizados foram desenhados no laboratório (UREB-DDI) e as sequências encontram-se descritas no **Anexo I**. A mistura de amplificação foi realizada num volume total de 25 µL, em que se adicionaram 2µL de DNA a 23µL de mistura de reação. A amplificação foi realizada num termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, AB)* e consistiu num ciclo inicial de desnaturação da cadeia de DNA durante 5 minutos a 95°C e uma hibridação inicial dos *primers* a 60°C durante 60 segundos, seguido de 35 ciclos compostos por uma extensão a 68°C durante 30 segundos, uma desnaturação 95°C durante 30 segundos, uma hibridação dos *primers* a 60°C durante 30 segundos e uma extensão final a 68°C durante 10 minutos. Em cada ensaio utilizou-se uma estirpe de *Brucella* como controlo positivo e água como controlo negativo.

1.4. Análise dos produtos amplificados por PCR

A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v). Para a preparação do gel, num volume de 120mL, dissolveu-se 1.8g de agarose (*SeaKem® LE Agarose*) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE 0,5x) e adicionou-se 2µL do corante *GelRed® Nucleic Acid Stain*, que permite a visualização das bandas no gel. Foi adicionado um volume de 5µL de DNA juntamente com 2µL de tampão de deposição

5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline) em cada poço, e no último poço foram colocados 2µL de marcador de pesos moleculares *HyperLadder® IV 100pb* (Bioline) (**Anexo IV**). A corrente aplicada foi de 100V durante 30 minutos. O gel foi colocado no aparelho *Gel Doc 2000* (BioRad) visualizado com o *software Quantity One® 4.4.0* (BioRad).

1.5. Sequenciação de DNA

A sequenciação automática do DNA obtido foi feita na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) no INSA e foi efetuada após um processo de purificação e sequenciação prévios. A purificação foi realizada com o reagente *ExoSAP*, que consiste em duas enzimas, uma exonuclease e uma fosfatase, cuja função consiste na remoção do excesso de *primers* e dNTPs, dos produtos de PCR que podem interferir na sequenciação. Foram utilizados 5µL do produto de PCR e 2µL de *ExoSAP*. A purificação foi efetuada no termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, AB), um ciclo de 37°C durante 15 minutos, para incubação da enzima e 80°C durante 15 minutos, para inativação da mesma. Na reação de sequenciação cíclica foram utilizados 2µL de DNA purificado e 8µL de uma mistura de reação contendo 5.5µL de água, 0.5µL de *primer forward*, de cada um dos genes, e 2µL de *BigDye® V1.1*. A sequenciação foi efetuada no termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, AB), constituída por um ciclo a 96°C durante 30 segundos e 25 ciclos a 96°C durante 10 segundos, a 50°C durante 5 segundos e a 60°C durante 4 minutos.

1.6. Análise Bioinformática

As sequências obtidas foram visualizadas no *software Chromas LITE 2.1.1*. e comparadas recorrendo ao programa *MultAlin* [23]. Para a avaliação da variabilidade genética, utilizaram-se os alinhamentos das sequências de nucleótidos gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1*. [46]. Os alinhamentos obtidos foram utilizados na análise dos parâmetros evolutivos e na construção de árvores filogenéticas através do *software MEGA6* [94].

2. Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)

2.1. Cultura de estirpes de *Brucella*

As estirpes de *Brucella* utilizadas no ensaio do MLVA16 pertencem à coleção de estirpes da Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação (UREB) do Departamento de Doenças Infeciosas (DDI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Umas obtidas através da rede de vigilância epidemiológica de *Brucella*, outras cedidas pelo Instituto Salud Carlos III em Madrid, pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e pelo repositório de estirpes do projeto Quandhip (*Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens*). A cultura de estirpes foi efetuada do modo descrito no ponto 1.1.

Tabela 3. Estirpes de *Brucella* utilizadas no ensaio MLVA16.

<i>Estirpe</i>	<i>Origem</i>	<i>Local</i>	<i>Espécie</i>	<i>Ano</i>
16M	Referência	-	<i>B. melitensis</i> bv 1	-
43B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
44B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
66B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
35B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
38B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
165B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
36B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
168B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
40B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
41B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2012
1B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2010
166B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2014
147B	Humano	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2013
47Bm3	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2001
770Bm1	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
4Bs2	Suíno	Portugal	<i>B. suis</i>	2000
668Bm1	Ovino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
256Ba3	Bovino	Portugal	<i>B. abortus</i>	2005
782Bm1	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2007
194Bs2	Suíno	Portugal	<i>B. suis</i>	2011
918Bm3	Caprino	Portugal	<i>B. melitensis</i>	2011
167/00E	Humano	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2000
170/04E	Humano	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2004
228/03E	Humano	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2003
194/00E	Humano	Espanha	<i>B. melitensis</i>	2000
146-10	Humano	Espanha	<i>B. abortus</i> 159094	-
146-12	Humano	Espanha	<i>B. melitensis</i> 159096	-

104-11	Humano	Alemanha	<i>B. melitensis</i>	-
104-12	Humano	Alemanha	<i>B. melitensis</i>	1997
148-9	Humano	Bélgica	<i>B.melitensis</i> AF166/96	1992
183-4	Desconhecido	Hungria	<i>B.melitensis</i> strains foster	1952
183-6	Desconhecido	Hungria	<i>B.suis</i> strain paris	1952
183-7	Desconhecido	Hungria	<i>B.ovis</i> CNCTC6741	2009

2.2. Extração de DNA

A extração de DNA de *Brucella* para a realização do MLVA16 foi efetuada utilizando o kit de extração *QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen)*, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, no ponto 1.2.

2.3. Amplificação de VNTRs

A reação de amplificação foi realizada com o DNA total das estirpes. Na reação de PCR efetuada para o MLVA utilizou-se o *BIOTAQ® PCR Kit (Bioline)* constituído por: tampão 10xNH₄, solução de MgCl₂ 50mM e enzima *BIOTAQ DNA Polymerase* 5U/μL. A mistura de reação utilizada continha 6μL de água, 1.5μL de tampão, 1.4μL de MgCl₂ e 0.4μL de enzima, 5μL 200 μM de dNTPs, (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1.25μL de cada *primer* específico, para a amplificação de cada *locus*, em ambas as direções *forward* e *reverse*. Os 16 pares de *primers* utilizados, descritos no **Anexo II**, foram divididos em três grupos: painel 1 com 8 *loci* (bruce06, bruce08, bruce11, bruce12, bruce42, bruce43, bruce45 e bruce55), painel 2A com 3 *loci* (bruce18, bruce19 e bruce21) e painel 2B com 5 *loci* (bruce04, bruce07, bruce09, bruce16 e bruce30) [50]. Utilizou-se 12μL da mistura de reação para 3μL de DNA, perfazendo um volume de 15μL. A amplificação foi realizada num termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, AB)* e consistiu num ciclo inicial de desnaturação da cadeia de DNA durante 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos constituídos por uma desnaturação a 96°C durante 30 segundos, uma hibridação dos *primers* a 60°C durante 30°C segundos e uma extensão a 72°C durante 5 minutos. Em cada ensaio utilizou-se uma estirpe de referência (*Brucella melitensis* 16M) como controlo positivo e água como controlo negativo.

2.4. Análise dos produtos amplificados por PCR

Os produtos de amplificação foram detetados por eletroforese em gel de agarose a 3%

corado com *GelRed® Nucleic Acid Stain*. Foi adicionado um volume de 5µL de DNA juntamente com tampão de deposição 5x *DNA Loading Buffer Blue (Bioline)* em cada poço, no primeiro poço foram colocados 2µL de marcador de pesos moleculares *HyperLadder® IV 100pb (Bioline)* e no último poço foram colocados 2µL de marcador de pesos moleculares *GeneRuler® DNA Ladder 50pb (Anexo V)*. A corrente aplicada foi de 60V durante 4 horas. O gel foi visualizado com o *software Quantity One® 4.4.0 (BioRad)*. Os produtos esperados variam entre 76pb e 1076 pb para os 3 painéis estudados.

2.5. Análise Bioinformática (MLVA)

Os géis obtidos foram analisados e o tamanho dos fragmentos amplificados foi convertido em unidades de repetição em cada *locus* de acordo com a tabela (**Anexo III** previamente publicada [36, 44, 61]. A análise comparativa dos genótipos resultantes e a construção de árvores filogenéticas foram feitas com recurso ao *software BioNumerics v.3.5 (Applied Maths, Belgium)*. A análise de Clusters foi baseada no coeficiente categórico e no *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA)* [36]. A diversidade genética de cada locus, respetivos painéis e intervalos de confiança foi determinada recorrendo ao índice de diversidade Hunter & Gaston (HGDI) com a utilização de uma ferramenta disponível *online*, V-DICE, no website HPA (<http://www.hpabioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>) [36, 50].

III. Resultados

1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533

1.1. Estudo da diversidade genómica dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533, nas estirpes de *Brucella* em estudo

Para a realização do estudo da diversidade genómica dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533 procedeu-se inicialmente à amplificação por PCR de cada um dos genes alvo. Os fragmentos obtidos para o gene BAB1_0296 tinham 390 pb, para o gene BAB1_1101 405 pb e para o gene BAB1_1533 entre 504 a 513 pb. Nas **figuras 5, 6 e 7** podem-se observar os produtos amplificados, separados por eletroforese em gel de agarose para algumas das estirpes estudadas.

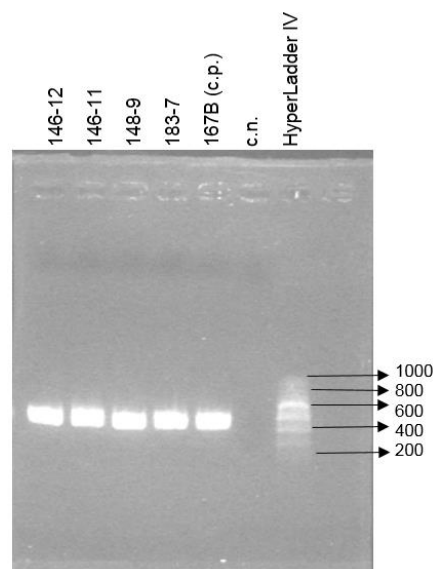


Figura 4. Produtos de amplificação do gene BAB1_0296 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *GelRed*[®]. Os poços 1, 2, 3 e 4 representam as estirpes 146-12, 146-11, 148-9, 183-7, respetivamente. O poço 5 representa a estirpe 167B, utilizada como controlo positivo. O poço 6 representa o controlo negativo (H₂O). O poço 7 representa o marcador de pesos moleculares *HyperLadder*[®] IV 100pb (*Bioline*).

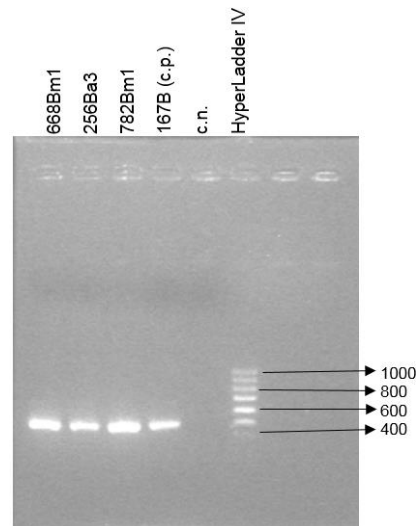


Figura 5. Produtos de amplificação do gene BAB1_1101 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *GelRed*[®]. Os poços 1, 2 e 3 representam as estirpes 668Bm1, 256Ba3 e 782Bm1, respetivamente. O poço 4 representa a estirpe 167B, utilizada como controlo positivo. O poço 5 representa o controlo negativo (H₂O). O poço 6 representa o marcador de pesos moleculares *HyperLadder*[®] IV 100pb (*Bioline*).

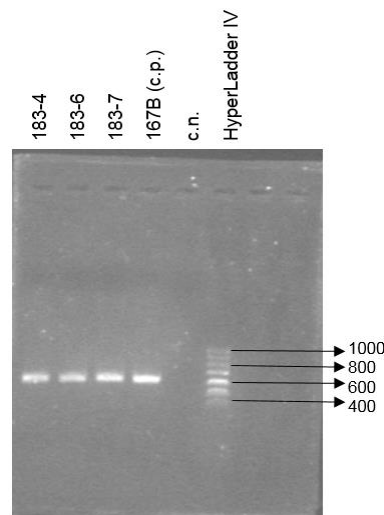


Figura 6. Produtos de amplificação do gene BAB1_1533 separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *GelRed*[®]. Os poços 1, 2 e 3 representam as estirpes 183-4, 183-6, 183-7, respetivamente. O poço 4 representa a estirpe 167B, utilizada como controlo positivo. O poço 5 representa o controlo negativo (H₂O). O poço 6 representa o marcador de pesos moleculares *HyperLadder*[®] IV 100pb (*Bioline*).

Os fragmentos obtidos foram sequenciados e as respetivas sequências foram visualizadas através do *software Chromas LITE 2.1.1*. [20], que permite observar a sequência de bases num cromatograma. As sequências obtidas de cada um dos três genes foram identificadas através da comparação por homologia com as sequências dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533 da estirpe de referência (*Brucella*

melitensis bv *Abortus* 2308), com recurso ao BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). No total foram obtidas 34 seqüências correspondentes ao gene BAB1_0296, 49 ao gene BAB1_1101 e 39 ao gene BAB1_1533. De modo a avaliar os parâmetros filogenéticos e evolutivos e a variabilidade genética das seqüências obtidas foi realizada uma análise bioinformática das seqüências nucleotídicas e respetivas seqüências de aminoácidos previstas.

1.2. Avaliação da variabilidade genética das seqüências dos genes BAB1

A análise das seqüências resultantes foi realizada com recurso ao *software MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) [23], em que foram alinhadas e comparadas, de modo a ser possível visualizar as diferenças nucleotídicas entre as seqüências das diferentes estirpes de *Brucella*. Posteriormente, as seqüências de nucleótidos foram traduzidas nas respetivas seqüências de aminoácidos com recurso ao *software EMBOSS transeq*. Esta análise foi efetuada em separado para as seqüências obtidas para cada um dos três genes em estudo.

1.2.1. Seqüências do gene BAB1_0296

Foi feito o alinhamento das 35 seqüências de nucleótidos do gene BAB1_0296 (Anexo VI) obtidas e da seqüência da estirpe de referência (*B. melitensis* bv *Abortus* 2308), representado na **figura 8**.

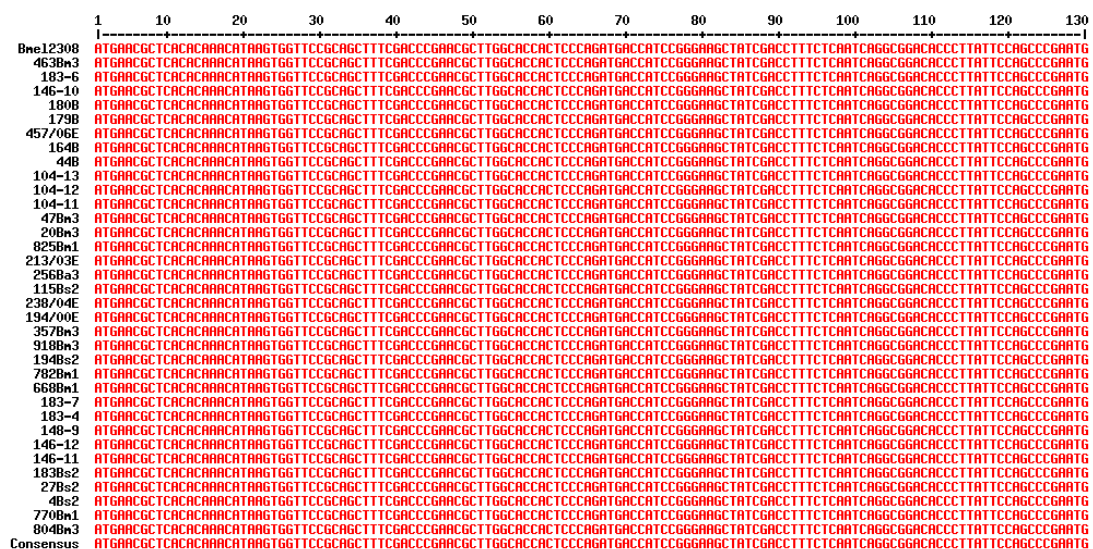


Figura 7. Alinhamento dos primeiros 130 nucleótidos das seqüências obtidas para o gene BAB1_0296.

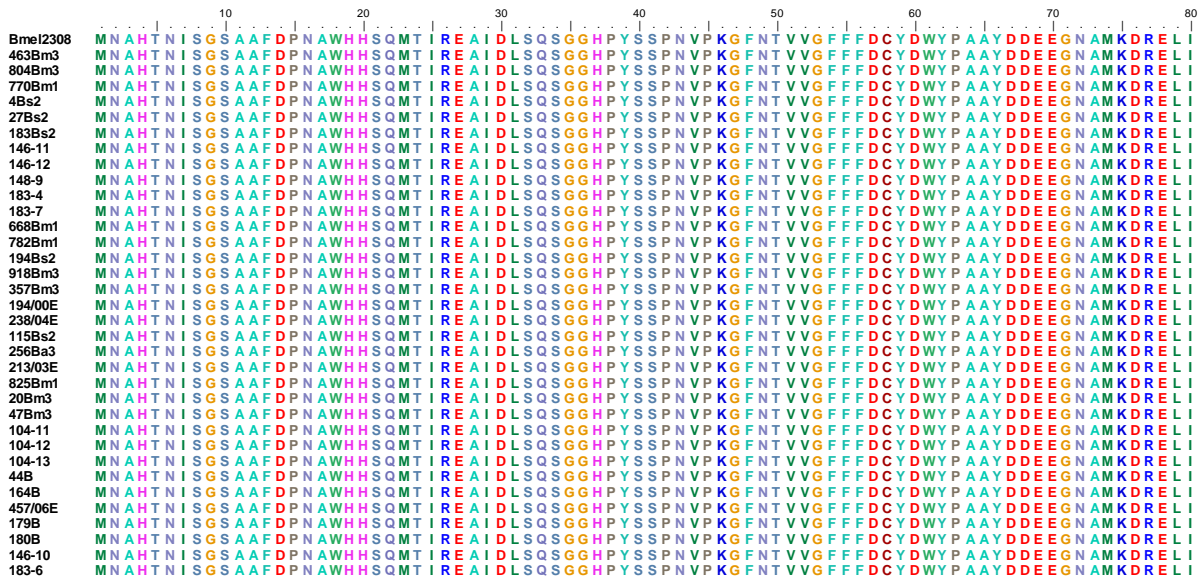


Figura 8. Alinhamento dos primeiros 80 resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_0296

Como se observa, as sequências de nucleótidos obtidas foram, na sua totalidade, idênticas à sequência da estirpe de referência, sendo cada uma constituída por 390 nucleótidos.

As sequências de nucleótidos foram posteriormente traduzidas, resultando em sequências de 129 aminoácidos, cada uma. O alinhamento encontra-se representado na **figura 9**, no qual se observou que a homologia entre as sequências é total, ou seja, não existe variabilidade entre as 35 sequências, do gene BAB1_0296, estudadas.

1.2.2. Sequências do gene BAB1_1101

O alinhamento gerado (**Anexo VII**), das sequências obtidas e a sequência de referência (*B. melitensis* *bv* *Abortus* 2308) do gene BAB1_1101, está representado na **figura 10**. Todas as sequências analisadas eram constituídas por 405 nucleótidos. Numa primeira observação do alinhamento (**figura 10**), as sequências apresentaram um elevado grau de semelhança, verificando-se apenas algumas substituições pontuais de nucleótidos. As sequências de nucleótidos foram posteriormente traduzidas nas respectivas sequências de aminoácidos, cada uma constituída por 134 resíduos. O alinhamento das mesmas encontra-se representado na **figura 11**, em que se observaram apenas duas substituições de aminoácidos, de uma asparagina (N) por uma lisina (K) e de uma arginina (R) por um triptofano (W).

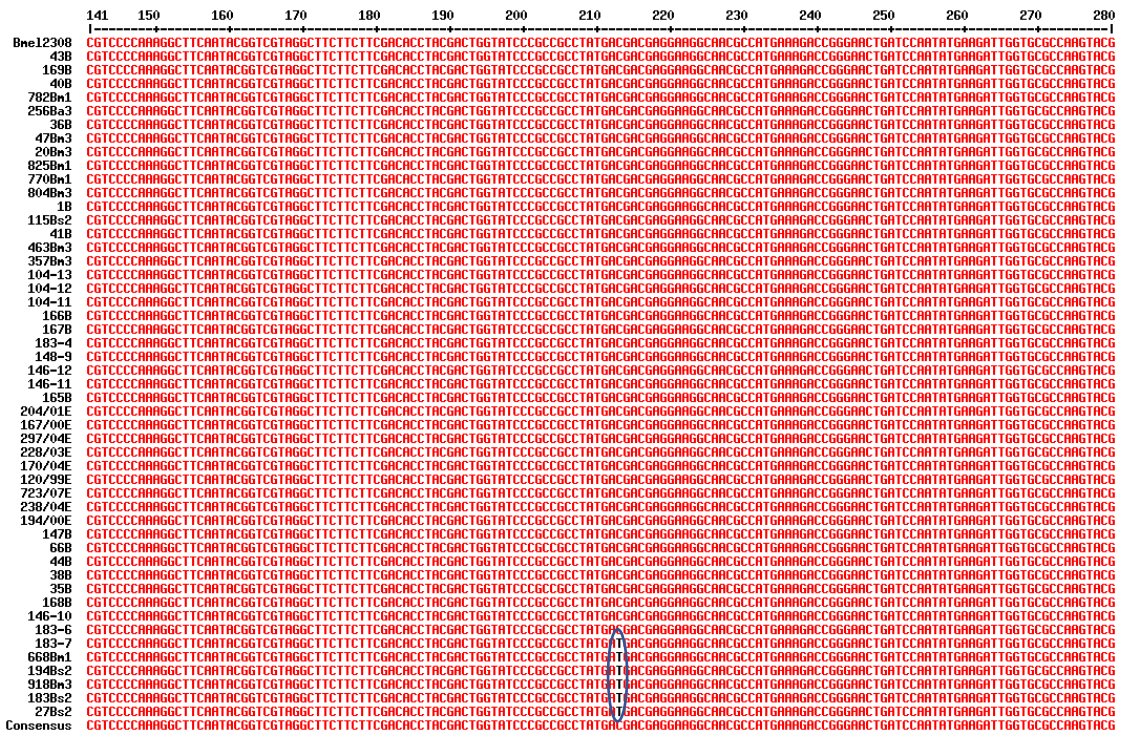


Figura 9. Alinhamento, dos 141 aos 280 nucleótidos, das sequências obtidas para o gene BAB1_1101. As substituições de nucleótidos encontram-se assinaladas com um círculo azul.

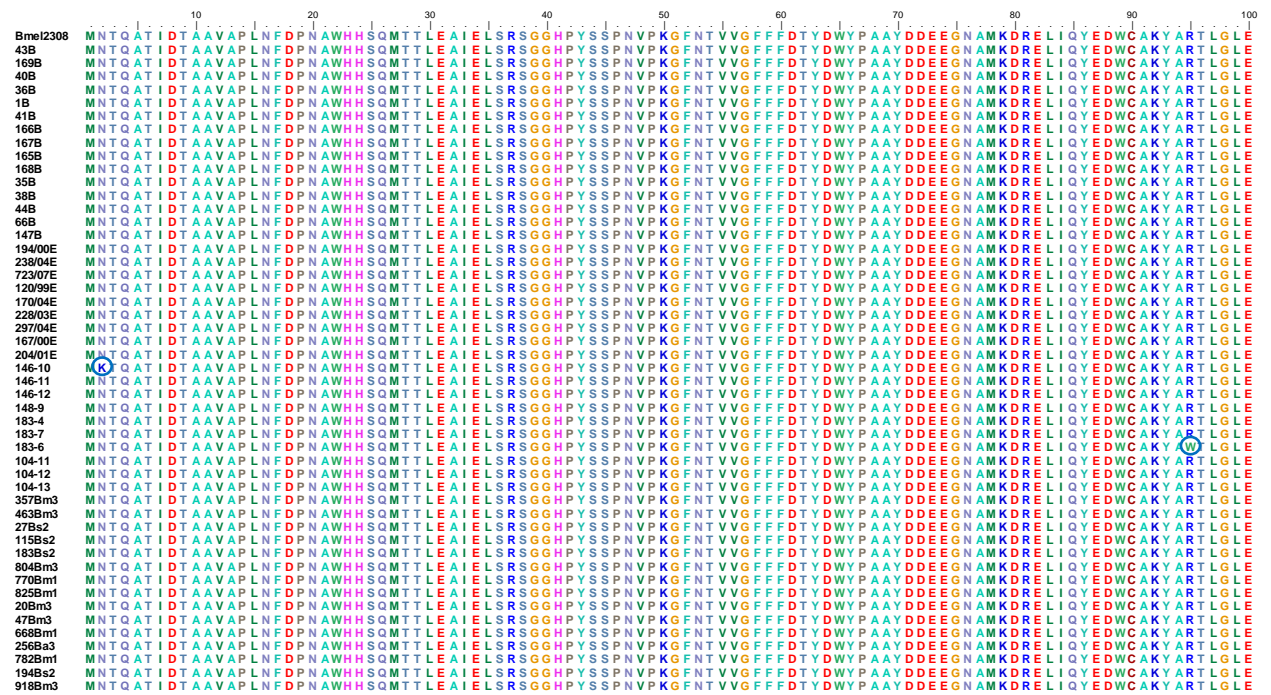


Figura 10. Alinhamento dos primeiros 100 resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_1101. As substituições de aminoácidos estão assinaladas com um círculo azul.

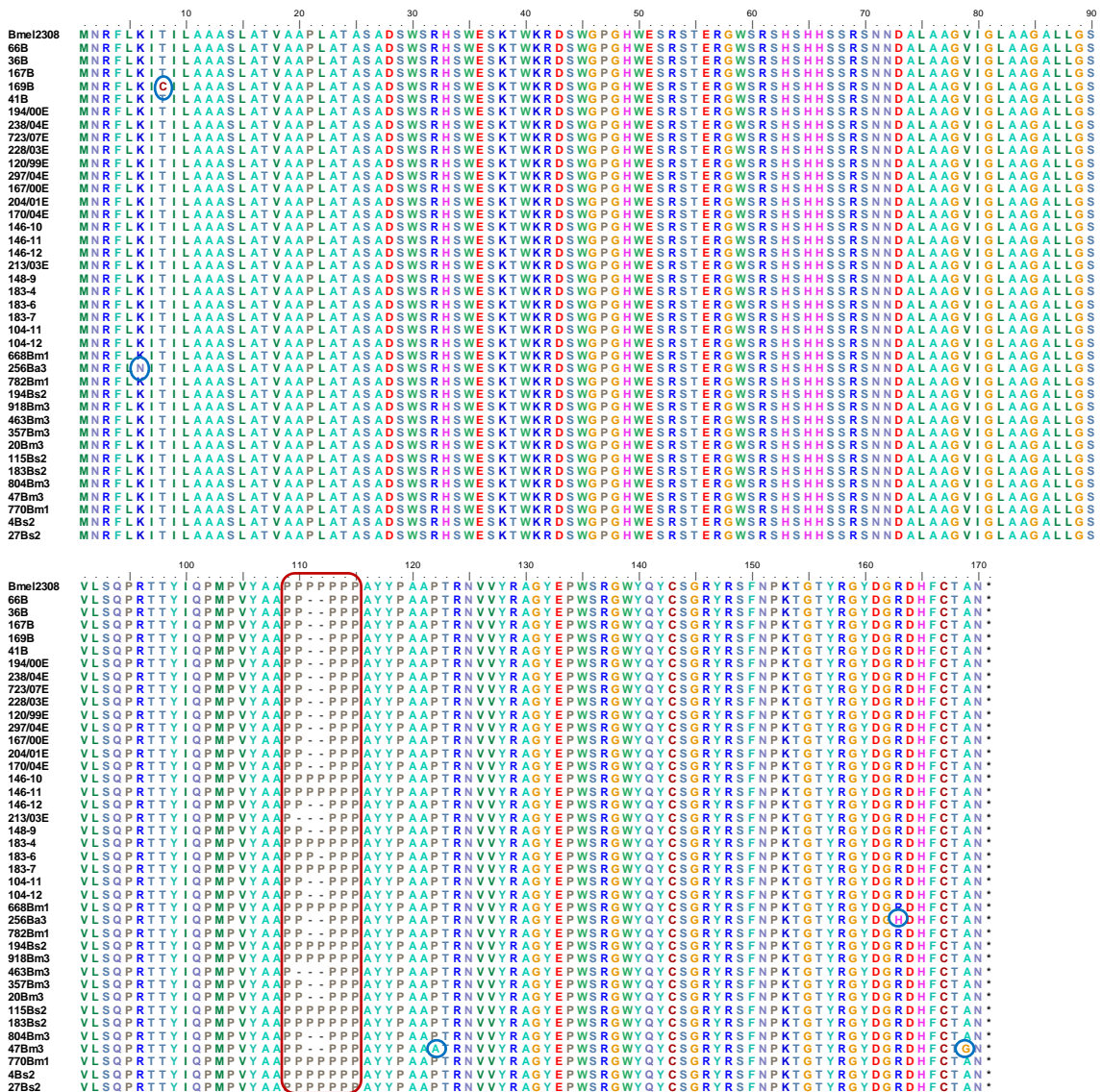


Figura 12. Alinhamento dos resíduos da sequência de aminoácidos do gene BAB1_1533. Os traços representam deleções. As substituições de aminoácidos estão assinaladas com um círculo azul e a vermelho encontra-se assinalada uma região rica em prolina e locais onde houve perda desse aminoácido.

1.3. Cálculo dos parâmetros evolutivos dos genes BAB1

Para uma melhor compreensão da relação e evolução destes genes, foram determinados parâmetros evolutivos das sequências de nucleótidos e aminoácidos obtidas para cada um dos três genes em estudo.

Para a realização do cálculo dos parâmetros evolutivos dos genes BAB1, recorreu-se ao software MEGA6 [94], utilizando-se os alinhamentos múltiplos de sequências de bases obtidas no BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 [46] pelo software ClustaW e utilizando Bootstrap Neighbor Joining Tree com 1000 réplicas.

Os parâmetros estudados incluíram o cálculo da distância molecular entre nucleótidos e aminoácidos e a frequência de substituições sinónimas (K_s) e não sinónimas (K_a). As distâncias moleculares foram estimadas através do número de substituições *per site* entre duas sequências e revelaram-se úteis para a reconstrução filogenética. Este parâmetro foi determinado pelo método *Kimura 2-parameter*, que assume que a proporção de transições é superior à das transversões [94]. As substituições sinónimas acontecem quando um nucleótido é substituído por outro sem que ocorra alteração do aminoácido. Por sua vez, as substituições não sinónimas verificam-se quando a substituição de um nucleótido por outro resulta na alteração do aminoácido codificado. Deste modo, a ocorrência de substituições sinónimas está menos restringida, sendo estas, por norma, mais frequentes que as não sinónimas que têm, geralmente, um efeito deletério, havendo uma maior tendência para a sua eliminação. Este parâmetro foi calculado pelo método *Nei-Gojobori*, que estima o número de substituições sinónimas e não sinónimas e o número de potenciais sítios sinónimos e não sinónimos. É possível detetar o tipo de seleção que está a atuar ao nível dos aminoácidos através da comparação entre a frequência entre substituições sinónimas e não sinónimas. A seleção positiva traduz-se na seleção a favor da fixação das substituições não sinónimas. A frequência de substituições não sinónimas deverá ser maior que a frequência de substituições sinónimas ($K_a > K_s$, $K_a/K_s > 1$). Contrariamente, a seleção purificadora traduz-se na seleção a favor da fixação das substituições sinónimas, em que a frequência destas deverá ser maior que a frequência de substituições não sinónimas ($K_a < K_s$, $K_a/K_s < 1$) [79, 80]. Este parâmetro foi determinado pelo teste de seleção *codon-based Z-test* de modo a avaliar a probabilidade de se rejeitar a hipótese nula da evolução ($K_a = K_s$) a favor da seleção positiva ou purificadora [94].

O estudo dos parâmetros evolutivos foi feito no total das sequências obtidas para cada um dos genes. Posteriormente, dividiram-se as sequências em diferentes grupos de acordo com o tipo de hospedeiro (humano ou animal), a origem geográfica (Portugal, Espanha, Alemanha e Hungria) e a espécie (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*).

1.3.1. Gene BAB1_0296

As sequências obtidas para o gene BAB1_0296 mostraram-se totalmente conservadas, não se verificando quaisquer substituições de nucleótidos e, conseqüentemente, de aminoácidos. Por este motivo, não se justificou a análise dos parâmetros evolutivos nas sequências obtidas para o gene BAB1_0296.

1.3.2. Gene BAB1_1101

A análise dos parâmetros evolutivos, referente ao gene BAB1_1101, encontra-se representada na **tabela 4**. Os parâmetros foram calculados para todas as sequências estudadas. Posteriormente, as sequências em estudo foram agrupadas de acordo com o hospedeiro, a origem geográfica e a espécie, de modo a estudar os parâmetros evolutivos, separadamente, em cada grupo.

Ao observar-se a tabela, verificou-se que a distância molecular entre nucleótidos é superior entre as sequências isoladas de um hospedeiro animal ($0,0011 \pm 0,0011$) e inferior entre sequências de estirpes humanas ($0,0002 \pm 0,0002$). Quando se analisou a distância entre aminoácidos, verificou-se que esta era 0 nas estirpes animais, indicando que as alterações de nucleótidos nestas sequências não produziram alterações nos aminoácidos, ou seja, todas as substituições eram sinónimas ($0,0049 \pm 0,0050$). Por outro lado, a frequência de substituições sinónimas nas sequências humanas foi nula, havendo apenas ocorrência de substituições não sinónimas ($0,0002 \pm 0,0002$).

Quando se analisou o grupo correspondente à origem geográfica das sequências observou-se que a distância entre nucleótidos foi igual a zero nas sequências pertencentes ao grupo da Alemanha. Por conseguinte, todos os outros parâmetros foram nulos, para as sequências constituintes deste grupo, uma vez que não existem diferenças entre nucleótidos. A distância molecular entre nucleótidos foi maior no conjunto de sequências provenientes da Hungria ($0,0033 \pm 0,0022$) e menor nas sequências originárias de Espanha ($0,0004 \pm 0,0004$). A distância entre aminoácidos também foi maior nas sequências húngaras ($0,0050 \pm 0,0049$), sendo nula nas sequências portuguesas, indicando que não existem substituições não sinónimas nestas sequências. As sequências húngaras apresentaram um valor de K_s ($0,0072 \pm 0,0072$) superior ao das portuguesas ($0,0031 \pm 0,0049$).

Tabela 4. Cálculo dos parâmetros evolutivos relativos às sequências nucleotídicas do gene BAB1_1101. Os parâmetros calculados incluem as distâncias moleculares entre nucleótidos e aminoácidos, a frequência de substituições sinónimas (Ks) e não sinónimas (Ka) e a razão entre ambas (Ka/Ks).

Sequências	Distância Molecular				
	Nucleótidos	Aminoácidos	Ks	Ka	Ka/Ks
BAB1_1101					
Sequências totais n=50	0,0007±0,0005	0,0006±0,0004	0,0023±0,0021	0,0003±0,0002	0,130±0,147
Hospedeiro¹ (n=47)					
Animal (n=16)	0,0011±0,0011	0	0,0049±0,0050	0	0
Humano (n=31)	0,0002±0,0002	0,0005±0,0005	0	0,0002±0,0002	-
Origem geográfica² (n=48)					
Portugal (n=30)	0,0007±0,0007	0	0,0031±0,0049	0	0
Espanha (n=12)	0,0004±0,0004	0,0012±0,0012	0	0,0005±0,0006	-
Hungria (n=3)	0,0033±0,0022	0,0050±0,0049	0,0072±0,0072	0,0022±0,0021	0,306±0,422
Alemanha (n=3)	0	0	0	0	-
Espécie³ (n=49)					
<i>B. melitensis</i> (n=41)	0,0002±0,0002	0	0,0010±0,0010	0	0
<i>B. abortus</i> (n=3)	0,0016±0,0016	0,0050±0,0050	0	0,0022±0,0021	-
<i>B. suis</i> (n=5)	0,0025±0,0017	0,0030±0,0028	0,0064±0,0064	0,0013±0,0012	0,203±0,276

¹Análise efetuada em todas as estirpes, exceto as estirpes 183-4, 183-6 e 183-7, uma vez que o hospedeiro de que foram isoladas é desconhecido.

²Análise efetuada em todas as estirpes, exceto a estirpe de referência e a estirpe 148-9, visto ser a única proveniente da Bélgica.

³Análise efetuada em todas as estirpes, exceto na estirpe 183-7, visto ser a única da espécie *B. ovis*.

Nas sequências espanholas, todas as substituições foram não sinónimas (0,0005±0,0006), sendo a sua frequência inferior à das sequências húngaras (0,0022±0,0021).

Na análise do conjunto em que as sequências se encontram agrupadas pela espécie a que pertencem, observou-se que a distância molecular entre nucleótidos foi maior nas estirpes de *B. suis* (0,0025±0,0017) e menor em *B. melitensis* (0,0002±0,0002). No que diz respeito à distância entre aminoácidos, nas sequências de *B. melitensis*, esta foi nula, mostrando a natureza sinónima (0,0010±0,0010) de todas as substituições nucleotídicas. A distância entre aminoácidos foi maior nas sequências de *B. abortus* (0,0050±0,0050), bem como o valor de Ka (0,0022±0,0021). A frequência de substituições sinónimas nas sequências de *B. suis* (0,0064±0,0064) foi superior à de *B. melitensis* (0,0010±0,0010) e *B. abortus*, nas quais não se verificaram substituições sinónimas.

Não foi possível efetuar o cálculo da razão Ka/Ks em todos os grupos, uma vez que em alguns deles a frequência de substituições sinónimas foi 0. Nos grupos em que este

cálculo foi possível, todos os valores da razão Ka/Ks foram menores que 1, sugerindo que nestas sequências está a atuar seleção purificadora.

1.3.3. Gene BAB1_1533

Os cálculos dos parâmetros evolutivos, referentes ao gene BAB1_1533 encontram-se representados na **tabela 5**.

Na observação da tabela verificou-se que a distância molecular entre nucleótidos e aminoácidos é maior entre as sequências isoladas de um hospedeiro animal ($0,0020 \pm 0,0010$ e $0,0030 \pm 0,0014$ respetivamente) do que nas sequências de estirpes humanas ($0,0009 \pm 0,0004$ e $0,0006 \pm 0,0006$ respetivamente). A frequência de substituições sinónimas e não sinónimas também foi superior nas sequências animais ($0,0041 \pm 0,0036$ e $0,0013 \pm 0,0006$ respetivamente) em relação às sequências humanas ($0,0021 \pm 0,0015$ e $0,0005 \pm 0,0005$ respetivamente).

Na análise do grupo constituído com base na origem geográfica das sequências observou-se que a distância entre nucleótidos foi zero nas sequências com origem na Alemanha. Deste modo, todos os outros parâmetros foram nulos, uma vez que não existem diferenças nucleotídicas entre as sequências. Relativamente à distância molecular entre nucleótidos, esta mostrou-se mais elevada nas sequências portuguesas ($0,0023 \pm 0,0010$) e mais baixa nas sequências de Espanha ($0,0005 \pm 0,0005$). A distância entre aminoácidos foi maior nas sequências portuguesas ($0,0030 \pm 0,0013$) e nula nas sequências espanholas e húngaras, indicando que todas as substituições de nucleótidos que ocorreram foram sinónimas. Ks foi maior nas sequências húngaras ($0,0052 \pm 0,0052$) do que nas portuguesas ($0,0044 \pm 0,0037$) e nas espanholas ($0,0020 \pm 0,0019$).

Na análise do conjunto de sequências agrupadas pela espécie a que pertencem, observou-se que a distância molecular entre nucleótidos foi maior nas estirpes de *B. abortus* ($0,0040 \pm 0,0022$) e menor em *B. suis* ($0,0009 \pm 0,0009$). No que diz respeito à distância entre aminoácidos, esta foi igualmente superior em *B. abortus* ($0,0080 \pm 0,0054$), e nula em *B. suis*, revelando a natureza sinónima ($0,0037 \pm 0,0035$) de todas as substituições nucleotídicas ocorridas nestas sequências. Os valores de Ks e Ka foram também mais elevados nas sequências de *B. abortus* ($0,0052 \pm 0,0052$ e $0,0035 \pm 0,0024$ respetivamente) do que nas restantes sequências.

O cálculo da razão Ka/Ks não foi possível em alguns dos grupos, uma vez que em alguns deles a frequência de substituições sinónimas foi 0. Nos grupos em que o cálculo foi possível, todos os valores da razão Ka/Ks foram menores que 1, sugerindo que nestas sequências está a atuar uma seleção purificadora.

Tabela 5. Cálculo dos parâmetros evolutivos relativos às sequências nucleotídicas do gene BAB1_1533. Os parâmetros calculados incluem as distâncias moleculares entre nucleótidos e aminoácidos, a frequência de substituições sinónimas (Ks) e não sinónimas (Ka) e a razão entre ambas (Ka/Ks).

Sequências	Distância Molecular				
	Nucleótidos	Aminoácidos	Ks	Ka	Ka/Ks
BAB1_1533					
Sequências totais (n=40)	0,0017±0,0009	0,0015±0,0006	0,0042±0,0033	0,0008±0,0004	0,191±0,177
Hospedeiro¹ (n=37)					
Animal* (n=16)	0,0020±0,0010	0,0030±0,0014	0,0040±0,0036	0,0013±0,0006	0,325±0,329
Humano* (n=21)	0,0009±0,0004	0,0006±0,0006	0,0021±0,0015	0,0005±0,0005	0,238±0,293
Origem geográfica² (n=38)					
Portugal (n=20)	0,0023±0,0010	0,0030±0,0013	0,0044±0,0037	0,0016±0,0007	0,364±0,345
Espanha (n=13)	0,0005±0,0005	0	0,0020±0,0019	0	0
Hungria (n=3)	0,0013±0,0012	0	0,0052±0,0052	0	0
Alemanha (n=2)	0	0	0	0	-
Espécie³ (n=39)					
<i>B. melitensis</i> (n=30)	0,0012±0,0006	0,0012±0,0032	0,0030±0,0040	0,0007±0,0018	0,233±0,676
<i>B. abortus</i> (n=3)	0,0040±0,0022	0,0080±0,0054	0,0052±0,0052	0,0035±0,0024	0,673±0,816
<i>B. suis</i> (n=6)	0,0009±0,0009	0	0,0037±0,0035	0	0

¹ Análise efetuada em todas as estirpes, exceto as estirpes 183-4, 183-6 e 183-7, uma vez que o hospedeiro de que foram isoladas é desconhecido.

² Análise efetuada em todas as estirpes, exceto a estirpe de referência e a estirpe 148-9, visto ser a única proveniente da Bélgica.

³ Análise efetuada em todas as estirpes, exceto na estirpe 183-7, visto ser a única da espécie *B. ovis*.

1.4. Análise filogenética das sequências dos genes BAB1

A análise da filogenia foi realizada através da criação de árvores pelo programa *MEGA6* [94], utilizando o teste de filogenia *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas e modelo *Kimura 2-parameter*, a partir de alinhamentos múltiplos de sequências de bases obtidas no *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5* [46] pelo software *ClustalW* e utilizando *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas.

1.4.1. Sequências do gene BAB1_0296

Como aconteceu em relação aos parâmetros estudados anteriormente, não se justificou a construção de árvore filogenética das sequências do gene BAB1_0296, uma vez que estas são idênticas entre si.

1.4.2. Sequências do gene BAB1_1101

A reconstrução filogenética, representada na **figura 14**, relativa ao gene BAB1_1101, das estirpes em estudo (n=49) e da estirpe de referência (*B. melitensis* bv *Abortus* 2308) (n=1), mostra uma conservação genômica entre todas as sequências independentemente da origem geográfica, do hospedeiro de origem e da espécie, com exceção de um grupo mais divergente, no qual se incluem 3 das estirpes de *B. suis*, evidenciando uma proximidade entre estas.

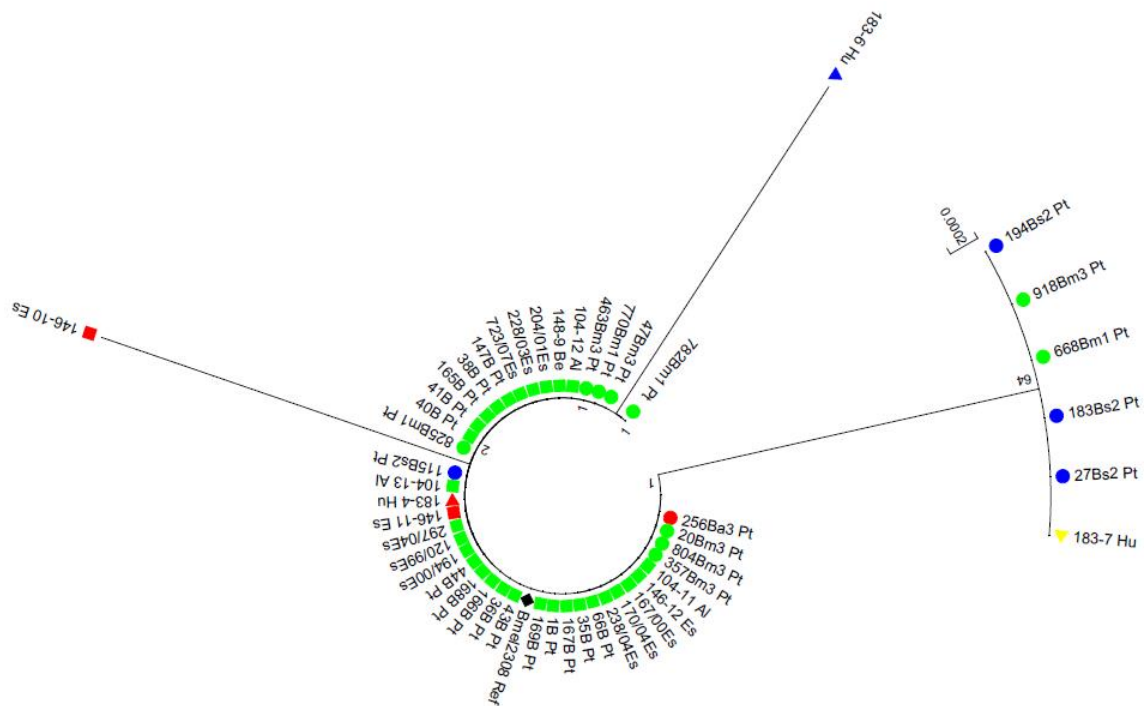


Figura 13. Árvore filogenética das 50 sequências do gene BAB1_1101, pertencentes às 49 estirpes em estudo e a 1 estirpe de referência (*B. melitensis* bv *Abortus* 2308). Os símbolos identificam o hospedeiro de origem de cada estirpe (◆-Referência, ■-Homem, ●-Animal, ▼-Desconhecido) e as cores referem-se à espécie (Preto- Referência, Verde- *B. melitensis*, Vermelho- *B. abortus*, Azul- *B. suis* e Amarelo- *B. ovis*).

Neste mesmo grupo, mais divergente, inclui-se também a única estirpe *B. ovis* em estudo. Observam-se também duas estirpes (146-10 e 183-6) mais distantes em relação a todas as outras. As sequências das estirpes pertencentes à espécie *B.*

melitensis mostraram-se muito próximas entre si, independentemente do hospedeiro e da origem geográfica, e em relação à estirpe de referência.

1.4.3. Sequências do gene BAB1_1533

A reconstrução filogenética, representada na **figura 15**, relativa ao gene BAB1_1533, das estirpes em estudo (n=39) e da estirpe de referência (*B. melitensis* *bv* *Abortus* 2308) (n=1), demonstrou uma proximidade entre a maioria das estirpes, com exceção de três estirpes mais distantes (256Ba3, 47Bm3 e 169B) e dois grupos mais divergentes das outras estirpes, mas próximos entre si. Um dos grupos evidenciou uma agregação das estirpes pertencentes à espécie de *B. suis* isoladas em animais. O outro grupo incluiu as duas estirpes *B. abortus* isoladas em humanos, a estirpe de referência e duas das estirpes húngaras (*B. melitensis* e *B. suis*). É de salientar, também a grande proximidade que se observou entre a maioria das sequências das estirpes de *B. melitensis*, independentemente do hospedeiro e da origem geográfica.

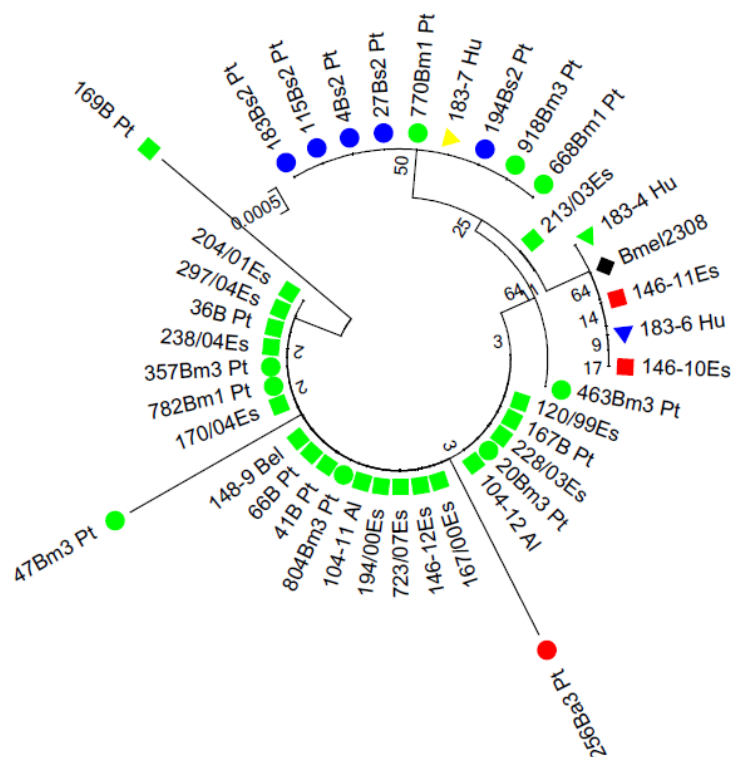


Figura 14. Árvore filogenética das 40 sequências do gene BAB1_1533, pertencentes às 39 estirpes em estudo e a 1 estirpe de referência (*B. melitensis* *bv* *Abortus* 2308). Os símbolos identificam o hospedeiro de origem de cada estirpe (◆-Referência, ■-Homem, ●-Animal, ▼-Desconhecido) e as cores referem-se à espécie (Preto- Referência, Verde- *B. melitensis*, Vermelho- *B. abortus*, Azul- *B. suis* e Amarelo- *B. ovis*).

2. Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)

2.1. Análise de VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*)

O ensaio MLVA16 (painel 1, painel 2A e painel 2B) foi realizado num total de 47 estirpes de *Brucella* (38 *B. melitensis*, 5 *B. suis*, 3 *B. abortus* e 1 *B. ovis*). A amplificação de todos os *loci* dos 3 painéis em estudo foi apenas possível em 20 das 47 estirpes em estudo. A amplificação de todos os *loci* do painel 1 foi conseguida em 33 estirpes, do painel 2A em 41 e do painel 2B em 32 das estirpes de *Brucella* em estudo. Na análise MLVA16 ficaram de fora as estirpes para as quais não foi possível amplificar todos os *loci* de cada um dos 3 painéis.

Tabela 6. Cálculo do *Hunter-Gaston Diversity Index* (HGDI) para os painéis do MLVA16. Os valores do HGDI vão de 0 (nenhum polimorfismo) a 1 (todas as amostras são diferentes) [55].

	Locus	Brucella		
		Genótipo	HGDI	CI
Painel 1	Bruce06	4	0.679	0.547 - 0.811
	Bruce08	4	0.616	0.501 - 0.730
	Bruce11	4	0.437	0.186 - 0.687
	Bruce12	4	0.647	0.485 - 0.810
	Bruce42	3	0.595	0.468 - 0.722
	Bruce43	3	0.626	0.485 - 0.768
	Bruce45	4	0.489	0.266 - 0.713
	Bruce55	5	0.716	0.557 - 0.875
Painel 2A	Bruce18	6	0.826	0.756 - 0.897
	Bruce19	3	0.532	0.343 - 0.720
	Bruce21	5	0.753	0.619 - 0.886
Painel 2B	Bruce04	8	0.905	0.870 - 0.941
	Bruce07	9	0.921	0.883 - 0.959
	Bruce09	9	0.789	0.628 - 0.951
	Bruce16	8	0.837	0.734 - 0.940
	Bruce30	7	0.774	0.659 - 0.888

Através do cálculo do Índice de Diversidade Hunter-Gaston (**tabela 6**), concluiu-se que, na análise destas estirpes, os marcadores mais discriminatórios foram Bruce04, Bruce07 e Bruce16, pertencentes ao painel 2B, apresentando índices de diversidade superiores a 0,837 e contendo 8, 9 e 8 alelos, respetivamente. Contrariamente, os marcadores que se revelaram mais homogéneos foram Bruce11, Bruce19, Bruce42 e

Bruce45, pertencentes ao painel 1 e painel 2A, a apresentar valores de HGDI inferiores a 0.6, contendo 4, 3, 3 e 4 variantes alélicas, respetivamente.

2.2. Análise MLVA16 de diferentes estirpes de *Brucella* e relações entre si

Na análise MLVA16, as estirpes em estudo agruparam-se em 3 *clusters* distintos, representados no dendograma da **figura 16**. Os dois primeiros (A1 e A2), constituídos na sua maioria por estirpes de origem humana. A1 continha apenas estirpes *B. melitensis*. As duas estirpes de *B. abortus* ficaram agrupadas em A2. A3 foi constituído por um maior número de estirpes isoladas de animais, nas quais se encontrou a única estirpe de *B. suis*.

Analisando o painel 1 (MLVA8) em separado as estirpes são apenas agrupadas em dois *clusters* (B1 e B2), como se observa na **figura 17**, sendo B1 constituído na sua maioria por estirpes isoladas no homem e contendo as duas estirpes pertencentes à espécie de *B. abortus*. Em B2 agruparam-se as estirpes *B. suis* e a única *B. ovis*. Em B2 ficaram também as 3 estirpes húngaras com hospedeiro de origem desconhecida.

Analisou-se também o painel 1 em conjunto com o painel 2A (MLVA11), no qual houve a formação de 4 *clusters* (C1, C2, C3 e C4), representados na **figura 18**. C3 foi constituído apenas por estirpes isoladas em humanos pertencentes à bactéria *B. melitensis*. C1 e C2 continham um maior número de estirpes humanas, sendo C2 constituído unicamente por estirpes de *B. melitensis* e C1 por *B. melitensis* e a duas estirpes de *B. abortus*. No *cluster* C4 ficaram agrupadas estirpes de *B. melitensis* e as estirpes de *B. suis*, bem como a única de *B. ovis*.

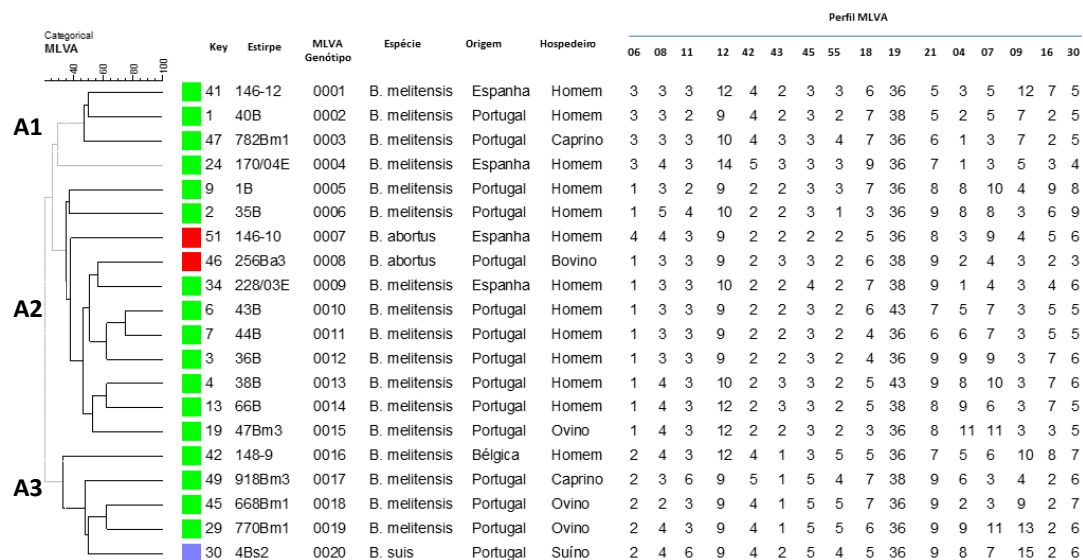


Figura 15. Dendrograma baseado no ensaio MLVA16 mostrando as relações de 20 estirpes de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*) em estudo. Nas colunas estão indicadas as informações relativas a cada estirpe.

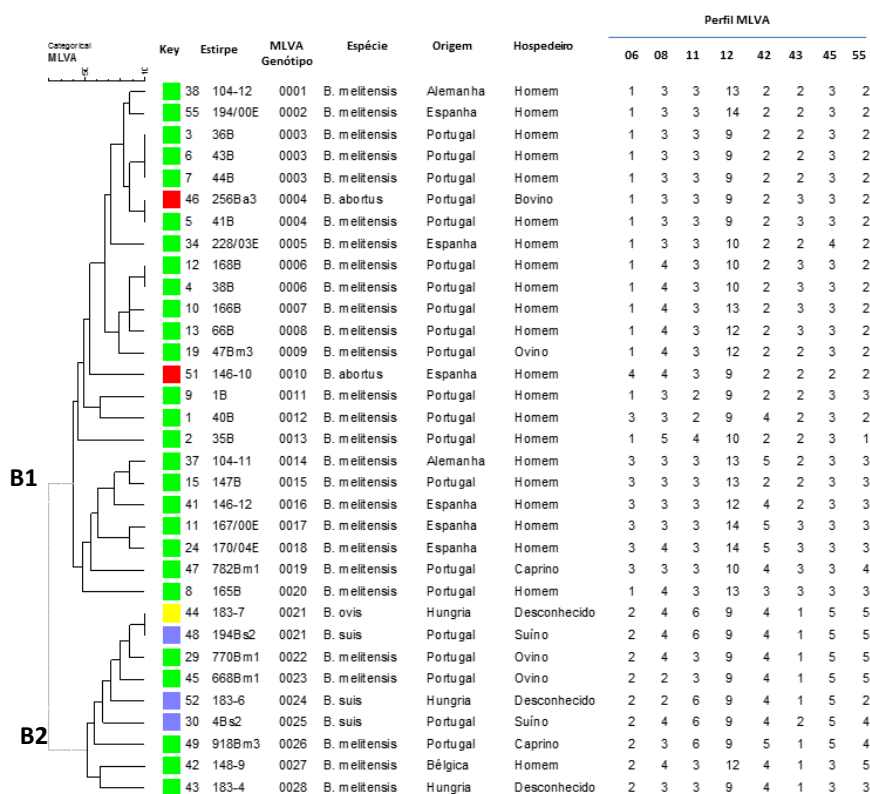


Figura 16. Dendrograma baseado no ensaio MLVA8 mostrando as relações de 33 estirpes de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis*) em estudo. Nas colunas estão indicadas as informações relativas a cada estirpe.

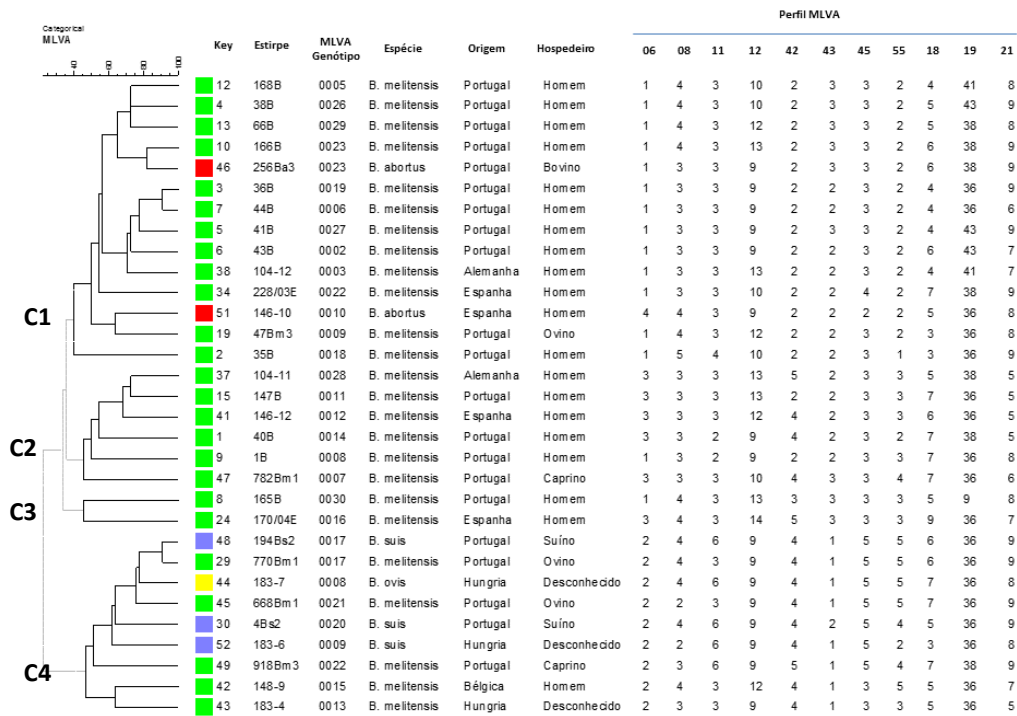


Figura 17. Dendrograma baseado no ensaio MLVA11 mostrando as relações de 31 estirpes de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. ovis*) em estudo. Nas colunas estão indicadas as informações relativas a cada estirpe.

IV. Discussão

1. Estudo dos efetores BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533

As espécies de *Brucella* constituem um género de bactérias muito homogéneo e são microrganismos intracelulares patogénicos, tanto para os animais como para o homem.

A translocação de proteínas efetoras desempenha um papel proeminente nos processos infecciosos de muitas bactérias patogénicas, como é o caso de *Brucella*. Como tal tem um papel importante na colonização do hospedeiro e na sobrevivência no interior das células ou tecidos do mesmo [3].

Nas bactérias do género *Brucella*, o T4SS, codificado pelo operão *virB*, está envolvido na secreção de proteínas efetoras [43]. Os efetores do T4SS são elementos, importantes para a sobrevivência e replicação intracelulares de *Brucella* [11]. Todavia, a identificação e caracterização das proteínas efetoras e suas respetivas funções tem-se mostrado um desafio [3].

No presente trabalho, um dos objetivos incidiu no estudo de 3 genes de *Brucella* que codificam para potenciais proteínas efetoras. Foi realizada a análise de três dos genes que codificam para potenciais proteínas efetoras (BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533). Em primeiro lugar, procedeu-se à amplificação dos fragmentos e à sua observação em gel de agarose. Não se verificaram diferenças significativas no tamanho das bandas, em nenhum dos genes amplificados para as diferentes estirpes de *Brucella*. Este facto dá-nos a indicação de que estes genes se encontram conservados em todas as estirpes de *Brucella* analisadas, corroborando a hipótese de que estes genes estão associados à virulência. Os genes codificantes de fatores de virulência de microrganismos patogénicos são cruciais para a sobrevivência dos mesmos nos respetivos hospedeiros, verificando-se uma tendência para uma maior conservação destes genes [52]. Outro fator que apoia a elevada conservação destes genes é o elevado grau de homologia entre os genomas das diferentes espécies de *Brucella*, uma vez que análises de comparação de genomas totais e de hibridização DNA-DNA revelam a relação muito próxima entre genomas de *Brucella*, com um grau de homologia superior a 90% [10].

Um avanço importante na caracterização do T4SS de *Brucella* tem sido a identificação de novos efetores. A caracterização das suas funções e os seus alvos será importante para a compreensão do modo como o T4SS medeia o tráfico intracelular de *Brucella* e contribui para a sua virulência [58]. Para investigar melhor estes genes, procedeu-se à sequenciação destes e subsequente análise da sequência de nucleótidos e aminoácidos.

Esta análise confirmou a hipótese de que os 3 genes se encontram conservados em todas as estirpes em estudo. A homologia entre os genes mostrou-se bastante elevada, sendo esta total num dos genes (BAB1_0296), cujas sequências de nucleótidos e aminoácidos se revelaram idênticas em todas as estirpes estudadas. As sequências do gene BAB1_1553 foram as que demonstraram maior divergência entre si. O gene BAB1_1533 codifica para uma proteína que contém uma região rica em prolina. Um dos aspetos interessantes observados nestas sequências foi uma deleção de 3-9 nucleótidos em algumas das estirpes analisadas, conduzindo à produção de uma proteína com menos resíduos de prolina. Os motivos de prolina estão geralmente associados à mediação de interações entre proteínas [68]. Regiões ricas em prolina desempenham também uma função importante na regulação e ligação aos domínios de sinalização intracelular [105]. Em certas bactérias patogénicas, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, existem muitas proteínas com regiões ricas em prolina [6]. Em *Brucella*, a função desta potencial proteína efetora permanece por caracterizar, contudo seria importante, em trabalhos futuros, tentar esclarecer as implicações desta deleção na funcionalidade da mesma.

As sequências do gene BAB1_1101 apresentaram poucas alterações a nível nucleotídico e consequentemente de aminoácidos.

Embora as diferenças entre as espécies de *Brucella* possam parecer relativamente pequenas quando comparadas com diferenças observadas noutros géneros, estas existem e são significativas, devendo-se contudo considerar o sistema em que essas mudanças ocorreram [38]. A pouca variabilidade genética de *Brucella* parece dever-se ao seu isolamento genético, resultado de uma especiação recente, coevolução e virulência restritas a um ou poucos hospedeiros [38, 39].

Os parâmetros evolutivos calculados para os genes BAB1 foram a distância entre nucleótidos e aminoácidos, que refletem as alterações ocorridas nas sequências ao

longo do tempo, a frequência de substituições sinónimas (K_s) e não sinónimas (K_a), e a razão entre ambas (K_a/K_s). As substituições de nucleótidos em genes codificantes de proteínas podem ser sinónimas (não alteram o aminoácido) ou não sinónimas (alteram o aminoácido). As alterações não sinónimas podem ter consequências positivas ou negativas para a *fitness* dos organismos, sendo geralmente eliminadas por seleção purificadora, ou, em determinadas condições podem ser fixadas através de seleção (positiva) [52, 80]. As mutações sinónimas, ou seja, as que não têm consequências significativas para a *fitness* do organismo, acumulam-se aleatoriamente, em proporção direta com a taxa de mutação [80]. Portanto, a investigação do número de substituições sinónimas e não sinónimas fornece informações sobre o tipo e grau de seleção a atuar num sistema [102].

O cálculo dos parâmetros evolutivos nos genes BAB1_1101 e BAB1_1533 foi realizado, com o intuito de compreender de uma forma mais abrangente a relação e evolução destes genes, apesar do número limitado de sequências reunidas. Para aumentar a significância estatística destes dados seria necessário um maior número de sequências, mas ainda assim foi possível retirar algumas indicações da análise dos dados disponíveis. Para o gene BAB1_0296 não se realizaram quaisquer cálculos uma vez que as sequências foram 100% idênticas. Para a análise dos parâmetros evolutivos dos genes BAB1_1101 e BAB1_1533 foi feito o agrupamento das sequências das várias estirpes de acordo com a origem geográfica, hospedeiro e espécie a que pertenciam. Em todos os grupos formados, para ambos os genes (BAB1_1101 e BAB1_1533) verificaram-se diferenças nucleotídicas entre as sequências de cada grupo, exceto nas estirpes alemãs cujas sequências se revelaram totalmente idênticas, provavelmente devido ao facto de terem em comum o mesmo hospedeiro (Homem), espécie (*B. melitensis*) e origem geográfica. As sequências de origem húngaras evidenciaram uma maior diversidade, sobretudo as pertencentes ao gene BAB1_1101, podendo esta maior distância entre eles dever-se ao facto de pertencerem a espécies diferentes. Em ambos os genes, as sequências de estirpes isoladas em animais mostraram-se mais distantes das que as sequências isoladas em humanos, provavelmente por terem sido isoladas de diferentes espécies de animais. A um nível mais global as sequências pertencentes ao gene BAB1_1533 mostraram-se menos próximas entre elas das que as sequências do gene BAB1_1101, no entanto os níveis de divergência não foram

significativos, evidenciando a proximidade dentro do género *Brucella*, cuja evolução é restringida pelo isolamento ecológico [102]. O cálculo de Ks e Ka foi importante para o cálculo da razão Ka/Ks. Este é um dos testes estatísticos mais amplamente utilizado para testar o tipo de seleção que se encontra a atuar numa sequência, pois quantifica pressões seletivas, comparando a taxa de substituições sinónimas com a taxa de substituições não sinónimas [56, 80]. O cálculo desta razão, embora não tenha sido possível em todos os grupos estudados, apresentou sempre valores inferiores a 1, nos grupos para os quais o seu cálculo foi efetuado, sugerindo que nestas sequências está a atuar seleção purificadora. Muitas das mutações que afetam a sequência de proteínas destes genes podem ter um efeito deletério, por isso é necessário que haja uma forte seleção purificadora a atuar nelas, de modo a eliminar estas mutações [52]. A seleção purificadora elimina as substituições que causam alterações de aminoácido, sendo por isso o tipo de seleção que atua de modo mais intenso em genes que codificam para proteínas com funções conservadas essenciais, causando uma evolução mais lenta das mesmas. Contrariamente, proteínas que estão menos limitadas funcionalmente, estão sujeitas a baixos níveis de seleção purificadora e consequentemente, evoluem mais rapidamente [52, 79]. Nas sequências em estudo, apesar de algumas limitações, como a alta homologia entre as sequências e o baixo número de sequências analisadas, os valores obtidos para Ka/Ks dão-nos a indicação de que existe uma pressão seletiva para manter a suposta função de virulência dos genes BAB1, função essencial à sobrevivência de *Brucella* no interior do hospedeiro.

Como cada espécie *Brucella* tem preferência por um hospedeiro específico, sobrevivendo quase exclusivamente em hospedeiros infetados, havendo poucos ou nenhuns mecanismos de troca genética relatados. Tendo-se, assim, sugerido que as espécies de *Brucella* devem ser consideradas populações clonais que evoluíram separadamente para sobreviver num hospedeiro específico [98].

Em organismos clonais ou quase clonais, métodos simples filogenéticas como NJ (*Neighbour Joining*) ou MP (*Maximum Parsimony*) são ideais para reconstruções filogenéticas devido aos seus baixos níveis de homoplasia [39], tendo-se por este motivo recorrido ao método NJ para a construção de árvores filogenéticas, utilizando as sequências obtidas neste trabalho. A análise filogenética, aqui realizada, teve como fim verificar se as diferenças entre os genes potencialmente associados à virulência

estavam associadas à espécie, hospedeiro ou origem geográfica das estirpes. A observação das árvores obtidas para as sequências de cada um dos genes evidenciou mais uma vez que o género *Brucella* é excepcionalmente monomórfico [39]. Não obstante esta proximidade entre as espécies de *Brucella*, a divergência a partir de um ancestral comum parece ter sido fortemente influenciada pelo aparecimento dos respetivos hospedeiros eucarióticos. A necessidade de adaptação diferencial de *Brucella* aos respetivos hospedeiros em diferentes origens geográficas parece explicar as diferenças entre as estirpes de *Brucella*, bem como o aparecimento de estirpes atípicas [98]. A sequenciação de genomas completos demonstra que os genomas de *B. suis*, *B. melitensis*, e *B. abortus* são muito similares a nível de sequência, organização e estrutura [47]. Esta similaridade também se verificou nas sequências dos genes em estudo. A análise filogenética das sequências do gene BAB1_1101 revelou, contudo uma maior proximidade entre as estirpes de *B. melitensis* e *B. abortus*, sendo consistente com outros estudos de filogenia que demonstram que existe uma proximidade maior entre estas duas espécies do que com as restantes espécies do género [39, 98]. A maior proximidade das estirpes *B. suis* entre si bem como a maior distância em relação às estirpes de outras espécies é apoiada por estudos que indicam *B. suis* como uma das espécies mais diversas de entre as espécies clássicas de *Brucella* e conseqüentemente mais distante de *B. abortus* e *B. melitensis* [39, 102]. Em relação ao gene BAB1_1533, continuou a observar-se uma grande proximidade entre as estirpes de *B. melitensis*. No entanto, as estirpes de *B. abortus*, isoladas em humanos e com origem espanhola mostraram-se mais afastadas da estirpe de *B. abortus*, isolada em animais e de origem portuguesa. Evidenciando, assim, diferenças adaptativas deste gene, potencialmente associado à virulência, relacionadas com o hospedeiro e a origem geográfica [98]. Estas mostraram-se também mais afastadas de *B. melitensis*. As estirpes de *B. suis* demonstraram mais uma vez proximidade entre si e maior distância em relação às outras [39]. Em relação à bactéria *B. ovis*, esta espécie ocupa uma posição basal na filogenia de *Brucella* [39], sendo uma das espécies mais divergentes do género [98]. Porém, no presente estudo, *B. ovis* encontra-se no mesmo grupo que *B. suis*. Alguns dos dados obtidos no estudo filogenético destes três genes, revelaram-se consistentes com outros estudos de filogenia, envolvendo genomas de *Brucella*

completos. Contudo, deve-se ter em atenção de que estes genes, estando associados à virulência, podem apresentar diferenças adaptativas específicas.

2. *Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA)*

O MLVA é uma técnica de tipagem molecular, em que a eficácia depende da seleção de marcadores moleculares independentes, cuja combinação proporcione um elevado poder discriminatório [61]. A utilização desta técnica em espécies muito próximas como *Brucella* torna possível a identificação e diferenciação ao nível da espécie e até de estirpe [88]. Este ensaio pode também ser utilizado como uma ferramenta epidemiológica importante no controlo de surtos e prevenção de brucelose [48], bem como no estudo da diversidade genética entre diferentes espécies de *Brucella* num contexto evolutivo [88].

Neste estudo, o principal objetivo foi pesquisar os polimorfismos dos VNTRs em isolados de *Brucella* de origem animal e humana de modo a avaliar o seu poder discriminatório, e investigar relações filogenéticas entre as diferentes estirpes em estudo. O ensaio MLVA16 (painel 1, painel 2A e painel 2B) foi realizado num total de 47 estirpes de *Brucella*. No entanto, não foi possível a amplificação de todos os *loci*, após várias amplificações. Uma das possíveis causas poderá ser a extração de DNA de *Brucella*, que deverá ser otimizada num futuro próximo, de modo a ser possível amplificar os *loci* em falta. Assim, a análise do poder discriminatório dos marcadores dos 3 painéis foi realizada tendo em conta as 20 estirpes para as quais a amplificação dos 16 *loci* foi conseguida. O cálculo do Índice de Diversidade Hunter-Gaston revelou que os marcadores mais discriminatórios foram Bruce04, Bruce07 e Bruce16, pertencentes ao painel 2B (HGDI>0,8) e consistente com trabalhos já realizados que indicam que quatro em cada cinco marcadores do painel 2B são extramente variáveis [1], geralmente com Índices de Diversidade superiores a 0,8 [10, 70]. O painel 1 demonstrou menor capacidade discriminatória, com 6 *loci* a apresentar valores de HGDI inferiores a 0,65. O painel 2A, de acordo com outros estudos, mostra-se mais variável do que o painel 1, mas menos do que o painel 2B [1]. No presente trabalho, os três *loci* constituintes apresentaram valores de HGDI entre 0,532 e 0,826. Outros

trabalhos [10, 70] obtiveram valores HGDI médios para o 2A inferiores a 0,75, o que se revela consistente com os dados obtidos neste trabalho. Os valores de HGDI aqui obtidos revelaram, no geral, um elevado poder discriminatório, o que demonstra que a escolha destes *loci* para a tipagem de *Brucella* é eficaz.

Na análise de *clusters*, com as 20 estirpes do MLVA16, observou-se a divisão em 3 *clusters*, sendo dois deles (A1 e A2) constituídos, na sua maioria, por estirpes de *B. melitensis* de origem humana, com as duas estirpes de *B. abortus* colocadas em A2. Em A3 foram agrupadas a maioria das estirpes animais, entre as quais a única estirpe de *B. suis*. De modo a entender melhor as relações entre as estirpes em estudo e de que modo esta técnica permite diferenciar as mesmas, foi feita uma análise de *clusters* para o MLVA8 (P1) e MLVA11 (P1+P2A), para os quais se conseguiu um maior número de estirpes, 33 e 31, respetivamente. O painel 1, com um poder menos discriminatório [1] dividiu as estirpes em apenas dois grupos, um constituído pelas estirpes de *B. melitensis* e *B. abortus* e outro em que ficaram as estirpes de *B. suis* e a única de *B. ovis*. A análise do painel 1 em conjunto com o painel 2A proporcionou dados mais interessantes, uma vez que estes dois painéis em conjunto possuem maior capacidade discriminatória, porque foi utilizado um número maior de estirpes do que na análise do MLVA16. As estirpes ficaram agrupadas em 4 *clusters*. Em C1 ficaram colocadas as 2 estirpes de *B. abortus*. C2 e C3 foram constituídos na sua maioria por estirpes de *B. melitensis* de origem humana. Em C4 foram agrupadas a maioria das estirpes de origem animal, entre as quais as estirpes de *B. suis* e de *B. ovis*. A análise de *clusters* para o MLVA16, MLVA11 e MLVA8 mostrou-se consistente, demonstrando uma separação entre as estirpes de origem animal e humana.

Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos na análise filogénica dos efetores e com outros estudos de filogenia em que se utilizaram genomas completos que colocam *B. melitensis* e *B. abortus* mais próximas entre si e mais afastadas de *B. suis* [39, 98].

V. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho, dividido em duas partes distintas (estudo dos efetores BAB1 e MLVA16), foi importante para amplificar o conhecimento acerca das espécies do género *Brucella*. O estudo dos efetores permitiu conhecer melhor as sequências de DNA e respetivas sequências de aminoácidos, que parecem estar envolvidas na virulência de *Brucella*, bem como traçar algumas relações entre diferentes estirpes e as suas origens. Embora o VirB *Brucella* T4SS tenha sido descrito pela primeira vez há mais de 10 anos, são ainda escassas as potenciais proteínas efetoras identificadas. Também as funções das proteínas já identificadas permanecem por caracterizar [11, 58]. Contudo, este trabalho constitui apenas o início de projetos futuros. Primeiramente será necessário o estudo de um maior número de estirpes de modo a consolidar resultados. Posteriormente, o estudo funcional das proteínas codificadas por estes genes, e o seu papel na virulência, será fundamental para uma compreensão integrada e abrangente dos mecanismos que permitem a *Brucella* sobreviver no interior da célula hospedeira. Um maior conhecimento destas proteínas é crucial para uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência de *Brucella*.

Relativamente ao ensaio MLVA16, este estudo foi relevante na medida em que permitiu acrescentar novas estirpes à base de dados e retirar algumas conclusões acerca das relações entre estas. Porém, esta é uma técnica recente e ainda existe muita investigação por realizar. Ainda no contexto do presente trabalho, será essencial a otimização dos processos de extração, de modo a ser possível amplificar os *loci* em falta, aplicando o ensaio MLVA16 a um número maior de estirpes. Contribuindo, desta forma, para o crescimento da base de dados MLVAbank. Também será fundamental comparar os dados obtidos com as estirpes já existentes na base de dados, o que não foi possível no âmbito deste trabalho.

Apesar de distintos, os dois estudos, revelaram dados filogenéticos equivalentes entre si e consistentes com outros estudos filogenéticos. O aumento do conhecimento do genoma de *Brucella* e a procura de polimorfismos revela-se cada vez mais importante, não só em estudos filogenéticos e epidemiológicos, mas também na explicação das diferenças nas características fenotípicas, virulência e de preferência de hospedeiro, observadas entre as espécies de *Brucella* [38, 98].

VI. Referências Bibliográficas

1. Al Dahouk S, Le Flèche P, Nöckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H: **Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis.** *J Microbiol Methods* 2007, **69**:137-145.
2. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H: **New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans.** *Rev sci tech Off int Epiz* 2013, **32** (1):177-188.
3. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ: **Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, **73**:775–808.
4. Araj GF: **Update on laboratory diagnosis of human brucellosis.** *Int Journal of Antimicrobial Agents* 2010, **36**(1):12-17.
5. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS: **Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages.** *Infect Immun* 2000, **68**:4255–4263.
6. Areschoug T, Linse S, Stalhammar-Carlemalm M, Heden LO, Lindahl G: **A proline-rich region with a highly periodic sequence in Streptococcal beta protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface.** *J Bacteriol* 2002, **184**:6376–6383.
7. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ: **Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: The Ioannina recommendations.** *PLoS Med* 2007, **4**(12):e317.
8. Atluri VL, Xavier MN, Jong MF, Hartigh AB, Tsolis RM: **Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts.** *Annu Rev Microbiol* 2011, **65**:523–541.
9. Azevedo C: **Biologia Celular e Molecular.** LIDEL Edições Técnicas, Lisboa 2005.
10. Banai M, Corbel M: **Taxonomy of *Brucella*.** *Open Veterinary Science Journal* 2010, **4**:85-101.
11. Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP: **Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle.** *FEMS Microbiol Rev* 2012, **36**:533–562.

12. Baykam N, Esener H, Ergönül O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B: **In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004, **23**:405-407.
13. Bayram Y, Korkoca H, Aypak C, Parlak M, Cikman A, Kilic S, Berktaş M: **Antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates from various clinical specimens.** *International Journal of Medical Sciences* 2011, **8**(3):198-202.
14. Bohlin J, Snipen L, Cloeckert A, Lagesen K, Ussery D, Kristoffersen AB, Godfroid J: **Genomic comparisons of *Brucella spp.* and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods.** *BMC Evolutionary Biology* 2010, **10**:249.
15. Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D: **Brucellosis: a worldwide zoonosis.** *Curr Opin Microbiol* 2001, **4**:58-64.
16. Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevielle C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D: **The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci* 2002, **99**:1544–1549.
17. Bricker BJ: **PCR as a diagnostic tool for brucellosis.** *Veterinary Microbiology* 2002, **90**:435-446.
18. Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J: **American Society for Microbiology live *Brucella spp.* fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of u937-derived phagocytes.** *Infection and Immunity* 1994, **62**(12):5267-5274.
19. Chain PS, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Agüero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E: **Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*.** *Infect Immun* 2005, **73**:8353-8361.
20. **Chromas Lite version 2.1** (2012), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.
21. Cloeckert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH: **Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future.** *Veterinary Microbiology* 2002, **90**:229-247.
22. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P: **Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of**

- neurobrucellosis.** *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2005, **76**:1025-1027.
23. Corpet F: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:10881-10890.
24. Cunha MV, Inácio J: **Abordagens Moleculares em Veterinária, como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infecção.** *LIDEL Edições Técnicas*, Lisboa 2014.
25. De Hertogh B, Lahlimi L, Lambert C, Letesson JJ, Depiereux E: **Design and implementation of a database for *Brucella melitensis* genome annotation.** *Veterinary Microbiology* 2008, **127**:369-378.
26. Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM: **Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system.** *Mol Microbiol* 2008 **70**:1378–96.
27. Di D, Cui B, Wang H, Zhao H, Piao D, Tian L, Tian G, Kang J, Mao X, Zhang X, Du P, Zhu L, Zhao Z, Mao L, Yao W, Guan P, Fan W, Jiang H: **Genetic polymorphism characteristics of *Brucella canis* isolated in china.** *PLoS ONE* 2014, **9**:e84862.
28. **Doenças de Declaração Obrigatória, 2009-2012 VOLUME II.** Direção de Serviços de Informação e Análise Divisão de Epidemiologia e Estatística. *Direção Geral da Saúde*, Lisboa 2014.
29. Doganay M, Aygen B: **Human Brucellosis: an overview.** *International Journal of Infectious Diseases*, 2003, **7**(3):173-182.
30. Döhmer PH, Valguarnera E, Czibener C, Ugalde JE: **Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival.** *Cellular Microbiology* 2014, **16**(3):396–410.
31. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control): **The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012.** *EFSA Journal* 2014; **12**(2):3547.
32. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöcka M: **Isolation of Potentially Novel *Brucella spp.* from Frogs.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:3753–3755.

33. Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA: **Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans.** *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2005, **11**:69-74.
34. European Centre for Disease Prevention and Control: **Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses.** Stockholm: ECDC, 2014.
35. Ferreira AC, Almendra C, Cardoso R, Pereira MS, Beja-Pereira A, Luikart G, Corrêa de Sá MI: **Development and evaluation of a selective medium for *Brucella suis*.** *Research in Veterinary Science* 2011, **93**(2):565-567.
36. Ferreira AC, Chambel L, Tenreiro T, Cardoso R, Flor L, Dias IT, Pacheco T, Garin-Bastuji B, Le Flèche P, Vergnaud G, Tenreiro R, de Sá MI: **MLVA16 typing of portuguese human and animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e42514.
37. Ferreira WC, Sousa JC: **Microbiologia.** LIDEL Edições Técnicas, Lisboa 2010.
38. Ficht T: ***Brucella* taxonomy and evolution.** *Future Microbiol* 2010, **5**:859-866.
39. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P: **Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*.** *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:2864-2870.
40. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL: **Human Brucellosis.** *The Lancet Infectious Diseases* 2007, **7**:775-786.
41. Gargani G, Lopez-Merino A: **International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Correspondence Report (Interim Report), 1991–1993.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **56**:1167–1168.
42. Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, Marcotty T, Pfeiffer D, Skjerve E: **A one health surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2013, **36**:241-248.
43. Gorvel JP: **“If you bring an alarm, we will destroy it,” said *Brucella* to the host cell.** *Virulence* 2014, **5**:460–462.

44. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G: **On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing.** *Biochimie* 2007, **90**: 660–668.
45. Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rosler U, Neubaeur H, Tomaso H: **Brucellosis – regionally emerging zoonotic disease.** *Croatian Medical Journal* 2010, **51**:289-95.
46. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
47. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC: **Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*.** *J Bacteriol* 2005, **187**:2715-2726.
48. Her M, Kang SI, Kim JW, Kim JY, Hwang IY, Jung SC, Park SH, Park MY, Yoo H: **A genetic comparison of *Brucella abortus* isolates from animals and humans by using an MLVA assay.** *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010, **20**: 1750-1755.
49. Jacobs MK: **The history of biologic warfare and bioterrorism.** *Dermatol Clin* 2004, **22**:231-246.
50. Jiang H, Wang H, Xu L, Hu G, Ma J, Xiao P, Fan W, Di D, Tian G, Fan M, Mi J, Yu R, Song L, Zhao H, Piao D, Cui B: **MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China.** *PLoS One* 2013, **8**:e76332.
51. Jolley KA, Chan M, Maiden MCJ: **mlstdbNet – distributed multilocus sequence typing (MLST) databases.** *BMC Bioinformatics* 2004, **5**:86.
52. Jordan IK, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV: **Microevolutionary genomics of bacteria.** *Theor Popul Biol* 2002, **61**:435–447.
53. Kattar MM, Jaafar RF, Araj GF, Le Flèche P, Matar GM, Abi Rached R, Khalife S, Vergnaud G: **Evaluation of a multilocus variablenumber tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:3935-3940.

54. Kaya O, Akçam FZ, Yayli G: **Investigation of the in vitro activities of various antibiotics against *Brucella melitensis* strains.** *Turk J Med Sci* 2012, **42**(1):145-148.
55. Kilic S, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslioglu E, Uyanik H, Aliskan H, Yasar E, Bayramoğlu G, Arslanturk A, Vergnaud G, Kantardjiev TV: **Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:3276–83.
56. Kryazhimskiy S, Plotkin JB: **The population genetics of dN/dS.** *PLoS Genet* 2008, **4**(12).
57. Kulakov YK, Zheludkov MM, Scljarov OD: **Variable-number tandem repeat markers for identification of *Brucella abortus* 82 and 75/79-av vaccine strains.** *Vaccine* 2010, **28**:41-45.
58. Lacerda TLS, Salcedo SP, Gorvel J: ***Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells.** *Current Opinion in Microbiology* 2013, **16**:45–51.
59. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP: ***Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor.** *Current Opinion in Microbiology* 2005, **8**:60–66
60. Lee S, Hwang KJ, Park MY, Hwang SD, Chai HY, Chu H, Park SH: **Evaluation and selection of multilocus variable-number tandem-repeat analysis primers for genotyping *Brucella abortus* biovar 1 isolated from human patients.** *Osong Public Health Res Perspect* 2013, **4**:265-270.
61. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nockler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G: **Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay.** *BMC Microbiol* 2006, **6**:9.
62. Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyon I, Moreno E: **Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS.** *Vet Microbiol* 2002 **90**:329–339.
63. Maquart M, Le Flèche P, Foster G, Tryland M, Ramisse F, Djønne B, Al Dahouk S, Jacques I, Neubauer H, Walravens K, Godfroid J, Cloeckert A, Vergnaud G: **MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*.** *BMC Microbiology* 2009, **9**:145.

64. Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ: **In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system.** *Cellular Microbiology* 2011, **13**(8): 1261–1274.
65. Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R: **Molecular characterization of the rpoB gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping.** *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2006, **8**:860-865.
66. Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibilia MT, Imbriani A, Amato R, Neri D, Cuccia M, Rinnone S, Di MV, Ciuchini F: **Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2923-2928.
67. Martinez TG, Pizarro CJ, Moreno E, Moriyon I: **The outer membranes of *brucella* spp. Are resistant to bactericidal cationic peptides.** *Infection and Immunity* 1995, **63**:3054–3061.
68. McNamara BP, Donnenberg MS: **A novel proline-rich protein, espf, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **166**:71–78.
69. Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M: **Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*.** *J Bacteriol* 1997, **179**:3244-3249.
70. Minharro S, Silva Mol JP, Dorneles EM, Pauletti RB, Neubauer H, Melzer F, Poester FP, Dasso MG, Pinheiro ES, Soares Filho PM, Santos RL, Heinemann MB, Lage AP: **Biotyping and genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 1977 to 2008.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e81152.
71. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A: **Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods.** *Journal of Clinical Microbiology* 2007, **45**:1211-1218.
72. Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I: ***Brucella* evolution and taxonomy.** *Vet Microbiol* 2002, **90**:209-227.

73. Pandit DP, Pandit PT: **Human Brucellosis: Are we neglecting an enemy at the backyard?** *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University* 2013, **6(4)**:350-358.
74. Pappas G, Solera J, Akritidis N, Tsianos E: **New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis.** *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**: 101–5.
75. Pappas G P, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E: **Brucellosis.** *N Engl J Med* 2005, **352**:2325-2336.
76. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV: **The new global map of human brucellosis.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**:91-99.
77. Pappas G: The **changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010, **36(1)**:S8-S11.
78. Posadas DM, Martín FA, Sabio y García JV, Spera JM, Delpino MV, Baldi P, Campos E, Cravero SL, Zorreguieta A: **The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence.** *Infection and Immunity* 2007, **75**:379-389.
79. Rocha EPC, Danchin A: **An Analysis of Determinants of Amino Acids Substitution Rates in Bacterial Proteins.** *Mol. Biol. Evol.* 2004, **21(1)**:108–116.
80. Rocha EPC, Smith JM, Hurst LD, Holden MTG, Cooper JE, Smith NH, Feil EJ: **Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes.** *Journal of Theoretical Biology* 2006, **239**: 226–235.
81. Rodrigues ALC, Silva SKL, Pinto BLA, Silva JB, Tupinambás U: **Outbreak of laboratory-acquired *Brucella abortus* in Brazil: a case report.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2013, **46(6)**:791-794.
82. Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I: **Specific detection of *Brucella* DNA by PCR.** *Journal of Clinical Microbiology* 1995, **33**:615-617.
83. Sauret JM, Vilissova N: **Human brucellosis.** *J Am Board Fam Pract* 2002, **15**:401–406.
84. Sayan M, Kilik S, Uyanik MH: **Epidemiological survey of rifampicin resistance in clinic isolates of *Brucella melitensis* obtained from all regions of Turkey.** *J Infect Chemother* 2012, **18**:41–46.
85. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M: **Isolation of *Brucella microti* from soil.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1316–1317.

86. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H: ***Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis***. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**:375–382.
87. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK: ***Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010, **60**:801-808.
88. Scholz HC, Vergnaud G: **Molecular characterization of *Brucella* species**. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 2013, **32**(1):149-162.
89. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N: **Brucellosis: A Reemerging Zoonosis**. *Veterinary Microbiology* 2010, **140**:392-398.
90. Shevtsov A, Tarlykov P, Zholdybayeva E, Shevtsova E, Momynkulov D, Sytnik I, Karibaev T, Chsherbakov A, Momynaliev K: **Draft genome sequence of the live vaccine strain *Brucella abortus* 82**. *Genome Announc* 2013, **1**(6):e01101-13.
91. Solera J: **Update on brucellosis: therapeutic challenges**. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010, **36**(1):S18-S20.
92. Supriya C, Umapathy BL, Rvikumar KL: **Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis**. *J Lab Physicians* 2010, **2**(2):55-60.
93. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ: **Brucellosis vaccines: past, present and future**. *Vet Microbiol* 2002 **90**:479–496.
94. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S: **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**. *Mol Biol Evol* 2013, **30**:2725–2729.
95. Tiller RV, De BK, Boshra M, Huynh LY, Van Ert MN, Wagner DM, Klena J, Mohsen TS, El-Shafie SS, Keim P, Hoffmaster AR, Wilkins PP, Pimentel G: **Comparison of two multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis methods for molecular strain typing of human *Brucella melitensis* isolates from the Middle East**. *J Clin Microbiol* 2009, **47**:2226-2231.
96. Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroilaki A, Loukaides F, Tselentis Y: **In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics**. *Annual of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006, **5**:24.

97. Videira, A: **Engenharia Genética, Princípios e Aplicações**. LIDEL Edições Técnicas, Lisboa 2001.
98. Vizcaíno N, Cloeckert A, Verger J, Grayon M, Fernández-Lago L: **DNA polymorphism in the genus *Brucella***. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2000 **2**:1089-1100.
99. Wattam AR, Foster JT, Mane SP, Beckstrom-Sternberg SM, Beckstrom-Sternberg JM, Dickerman AW, Keim P, Pearson T, Shukla M, Ward DV, Williams KP, Sobral BW, Tsolis RM, Whatmore AM, O'Callaghan D: **Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence**. *Journal of Bacteriology* 2014, **196**:920-930.
100. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, Almeida NF, Shukla M, Dickerman AW, Crasta OR, Kenyon R, Lu J, Shallom JM, Yoo H, Ficht TA, Tsolis RM, Munk C, Tapia R, Han CS, Detter JC, Bruce D, Brettin TS, Sobral BW, Boyle SM, Setubal JC: **Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle**. *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:3569-3579.
101. Whatmore AM: **Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens**. *Infection, Genetics and Evolution* 2009, **9**:1168-1184.
102. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP: **Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing**. *BMC Microbiol* 2007, **7**:34.
103. Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R, Bowen D, Hoffmaster AR: **Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high resolution melt analysis**. *Journal Clin Microbiol* 2010, **48**(3):697-702.
104. Wyatt HV: **Lessons from the history of brucellosis**. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 2013, **32**(1):17-25.
105. Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA: **The structure and function of proline recognition domains**. *Sci. STKE* 2003, **179**:Re8.
106. Zhan Y, Kelso A, Cheers C: **American Society for Microbiology differential activation of *brucella*-reactive cd41 t cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts**. *Infection and Immunity* 1995, **63**(3):969–975.

107. Zhong Z, Wang Y, Xu J, Chen Y, Ke Y, Zhou X, Yuan X, Zhou D, Yang Y, Yang R, Peng G, Jiang H, Yuan J, Song H, Cui B, Huang L, Chen Z: **Parallel gene loss and acquisition among strains of different *Brucella* species and biovars.** *Journal of Microbiology* 2012, **50**:567-574.
108. Yagupsky P, Baron EJ: **Laboratory exposure to *Brucellae* and implications for bioterrorism.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(8):1180-5.
109. Yu WL, Nielsen K: **Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction.** *Croatian Medical Journal* 2010, **51**:306-13.

VII. Anexos

ANEXO I

Anexo I – Sequência de nucleótidos dos *primers* utilizados na amplificação dos genes BAB1_0296, BAB1_1101 e BAB1_1533.

Primer	Sequência de Nucleótidos	Tamanho (pb)
Bab1_0296 AF	5' CTG CGA GCC GGT TAC TTG 3'	18
Bab1_0296 AR	5' TGG TTT GTG TAC CAC CTT TGG 3'	21
Bab1_1101 F	5' CGT TCC TGC GAA ATT TAA CC 3'	20
Bab1_1101 R	5' ATT ATG CTC CCC TGT TGT CG 3'	20
Bab1_1533 AF	5' CGG GTT TGC GTA GGA TAA TG 3'	20
Bab1_1533 AR	5' TTT TGC TGG TTG ATC GGT TC 3'	20

ANEXO II

Anexo II – Sequência de nucleótidos dos *primers* utilizados na amplificação dos *loci* do MLVA16.

VNTR	Alias	Chr	Primer (montante)	Primer (jusante)	Min- máx pb
BRU1543_8bp _152bp_2u	Bruce04	1	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG	152-208
BRU1322_134 bp_408bp_3u	Bruce06	1	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC	140-542
BRU1250_8bp _158bp_5u	Bruce07	1	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	ACCCTTTTCAGTCAAGGCAAA	150-190
BRU1134_18b p_348bp_4u	Bruce08	1	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	312-366
BRU588_8bp_ 156bp_7u	Bruce09	1	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	124-244
BRU211_63bp _257bp_2u	Bruce11	1	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG	257-698
BRU73_15bp_ 392bp_13u	Bruce12	2	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	302-452
BRU548_8bp_ 152bp_3u	Bruce16	2	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT	GGCCATGTTCCGTTGATTTAT	144-240
BRU339_8bp_ 146bp_5u	Bruce18	2	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	130-170
BRU324_6bp_ 163bp_18u	Bruce19	2	GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	76-190
BRU329_8bp_ 148bp_6u	Bruce21	2	CTCATGCGCAACCAAAACA	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT	148-175
BRU1505_8bp _151bp_6u	Bruce30	1	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG	119-151
BRU424_125b p_539bp_4u	Bruce42	1	CATCGCCTCAACTATACCGTCA	ACCGCAAATTTACGCATCG	164-789
BRU379_12bp _182bp_2u	Bruce43	1	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	TATTTCCGCCTGCCATAAAC	170-194
BRU233_18bp _151bp_3u	Bruce45	1	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	133-187
BRU2066_40b p_273bp_3u	Bruce55	1	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT	194-354

ANEXO III

Anexo III – Tabela de correspondência entre o tamanho dos alelos (pb) de *Brucella* e o número de repetições (u).

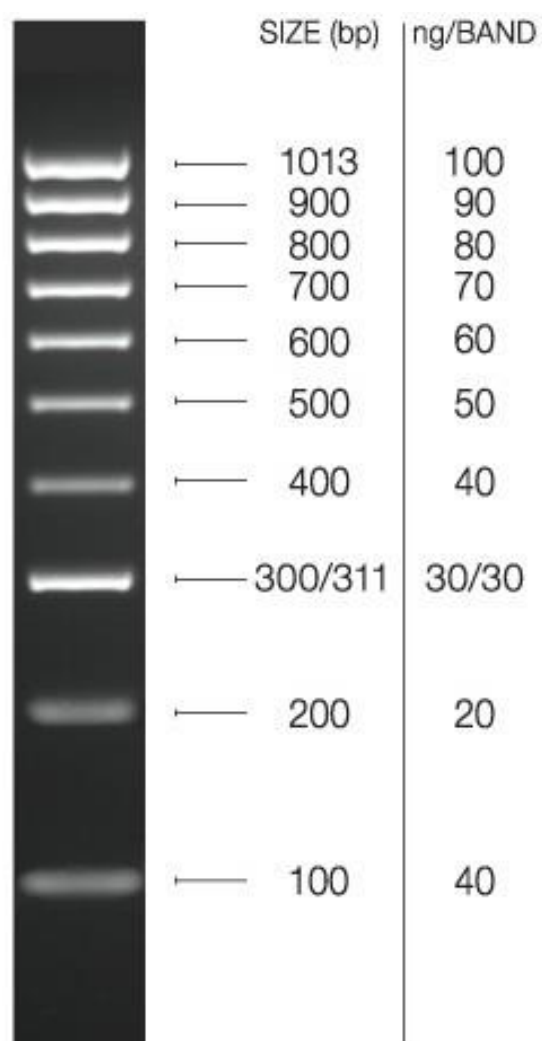
Panel 1 (agarose2%)														
bruce06-BRU1322_134bp_408bp_3u	140 (1u)	274 (2u)	408 (3u)	542 (4u)										
bruce08-BRU1134_18bp_348bp_4u	312 (2u)	330 (3u)	348 (4u)	366 (5u)	384 (6u)									
bruce11-BRU211_63bp_257bp_2u	257 (2u)	320 (3u)	383 (4u)	509 (6u)	635 (8u)	698 (9u)	887 (12u)	1013 (14u)	1076 (15u)					
bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u	^a 302 (7u)	^b 317 (8)	327-332 (9u)	342-347 (10u)	362 (11u)	377 (12u)	392-397 (13u)	407-411 (14u)	422 (14u)	437 (14u)	452 (14u)			
bruce42-BRU424_125bp_539bp_4u	164 (1u)	289 (2u)	414 (3u)	539 (4u)	664 (5u)	789 (6u)	914 (7u)							
bruce43-BRU379_12bp_182bp_2u	170 (1u)	182 (2u)	194 (3u)											
bruce45-BRU233_18bp_151bp_3u	133 (2u)	151 (3u)	169 (4u)	187 (5u)										
bruce55-BRU2066_40bp_273bp_3u	193 (1u)	233 (2u)	273 (3u)	313 (4u)	353 (5u)	393 (6u)	433 (7u)				^a 553 (10u)			
Panel 2A (agarose3%)														
bruce18-BRU339_8bp_146bp_5u	130 (3u)	138 (4u)	146 (5u)	154 (6u)	162 (7u)	170 (8u)	178 (9u)	^a 186 (10u)						
bruce21-BRU329_8bp_148bp_6u	140 (5u)	148 (6u)	156 (7u)	164 (8u)	172 - 175 (9u)									
Panel 2B (agarose3%)														
bruce04-BRU1543_8bp_152bp_2u	144 (1u)	152 (2u)	160 (3u)	168 (4u)	176 (5u)	184 (6u)	192 (7u)	200 (8u)	208 (9u)	216 (10u)	224 (11u)	232 (12u)	240 (13u)	248 (14u)
	256 (15u)	264 (16u)	272 (17u)	280 (18u)	288 (19u)	296 (20u)	304 (21u)	312 (22u)	320 (23u)		360 (28u)			
bruce07-BRU1250_8bp_158bp_5u	134 (2u)	142 (3u)	150 (4u)	158 (5u)	166 (6u)	174 (7u)	182 (8u)	190 (9u)	198 (10u)	206 (11u)	214 (12u)	222 (13u)	230 (14u)	
	246 (16u)													
bruce09-BRU588_8bp_156bp_7u	124 (3u)	132 (4u)	140 (5u)	148 (6u)	156 (7u)	164* (8u)	172 (9u)	180 (10u)	188 (11u)	196 (12u)	204 (13u)	212 (14u)	220 (15u)	228 (16u)
	236 (17u)	244 (18u)	252 (19u)	260 (20u)	268 (21u)	276 (22u)	284 (23u)	292 (24u)						
bruce16-BRU548_8bp_152bp_3u	144 (2u)	152 (3u)	160 (4u)	168 (5u)	176 (6u)	184 (7u)	192 (8u)	200 (9u)	208 (10u)	216 (11u)	224 (12u)	^a 232 (13u)	240 (14u)	248 (15u)
	^b 254 (16u)		^b 270 (18u)											
bruce30-BRU1505_8bp_151bp_6u	119 (2u)	127 (3u)	135 (4u)	143 (5u)	151 (6u)	159 (7u)	167 (8u)	175 (9u)	183 (10u)	191 (11u)	199 (12u)			
Previous Panel 2A member														
bruce19-BRU324_3bp_163bp_36u	76 (7u)		82 (9u)		^b 88 (11u)		163 (36u)		169 (38u)	^c 172 (39u)	^c 175 (40u)	178 (41u)		184 (43u)
	187 (44u)	190 (45u)	193 (46u)		202 (49u)									

darker gray is the *in silico* inferred size in 16M genome sequence (NC_003317 and NC_003318) * observed size in Nouzilly-Orsay 16M reference strain
The indicated PCR product sizes are as obtained when using the primers published in Le Flèche et al. 2006 BMC microbiology. They need to be adjusted if alternative primers are used.
DNA sizing equipment must be calibrated by using reference strains as raw size estimates may need to be adjusted.
^a Alleles observed in *B. microti* isolates ^b Alleles observed in *B. cetii* isolates ^c Allele observed in *B. inopinata*
Le Flèche et al. 2006 version 3.6 (last modified April 22 2013)
Version 3.6 minor format errors; Version 3.5 and 3.4 modifications concern the alleles size range for locus Bruce21-BRU329_8bp_148bp_6u: (172-175)bp encoded 9u;
for locus bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u: (327-332)bp encoded 9u; (342-347) encoded 10u; (392-397)bp encoded 13u and all alleles larger than 407bp are called 14u;
locus Bruce19-BRU324_6bp_163bp_18u is renamed bruce19-BRU324_3bp_36u and new alleles size range is presented

ANEXO IV

Anexo IV – Marcador de peso molecular *HyperLadder*[®] IV 100pb (*Bioline*)

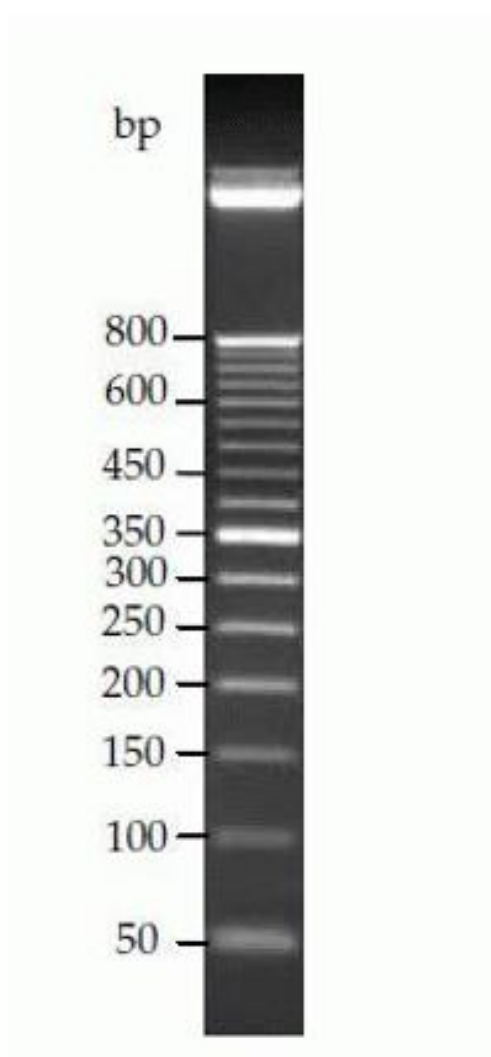
(<http://www.bioline.com/us/hyperladder-100bp.html>).



ANEXO V

Anexo V – Marcador de peso molecular *GeneRuler® DNA Ladder* 50pb

(<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10416014>).



ANEXO VI

Anexo VI – Alinhamento completo das sequências obtidas a partir da amplificação do gene BAB1_0296.

