



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ANÁLISE EM *MULTILOCUS* DE REPETIÇÕES EM
TANDEM DE NÚMERO VARIÁVEL (MLVA) DE
LINHAGENS VACINAIS B19 e RB51 DE *BRUCELLA*
*ABORTUS***

ANA PAULA PAIVA DE FARIA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2010**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ANÁLISE EM *MULTILOCUS* DE REPETIÇÕES EM *TANDEM* DE NÚMERO
VARIÁVEL (MLVA) DE LINHAGENS VACINAIS B19 E RB51 DE *BRUCELLA*
*ABORTUS***

ANA PAULA PAIVA DE FARIA

**ORIENTADOR: RICARDO TITZE DE ALMEIDA
CO-ORIENTADORA: SIMONE PERECMANIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 021 / 2010

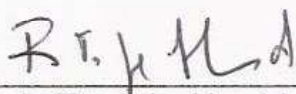
**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2010**

ANÁLISE EM *MULTILOCUS* DE REPETIÇÕES EM *TANDEM* DE NÚMERO VARIÁVEL (MLVA) DE LINHAGENS VACINAIS B19 E RB51 DE *BRUCELLA ABORTUS*

ANA PAULA PAIVA DE FARIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

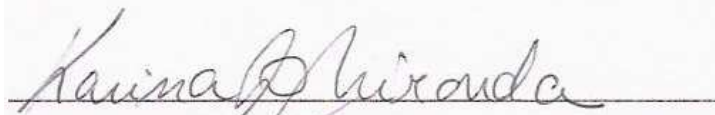
APROVADA POR:



Ricardo Titze de Almeida (ORIENTADOR)

Doutorado em Patologia Molecular

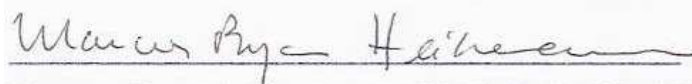
Professor adjunto UnB - FAV



Karina Leite Miranda (EXAMINADOR EXTERNO)

Doutorado em Ciência Animal

Emater - DF



Marcos Bryan Heinemann (EXAMINADOR EXTERNO)

Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Professor adjunto UFMG – Escola de Veterinária

BRASÍLIA/DF, 31 de março de 2010

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FARIA, A. P. P. **Análise em *multilocus* de repetições em *tandem* de número variável (MLVA) de linhagens vacinais B19 e RB51 de *Brucella abortus***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 39 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faria, Ana Paula Paiva de.

Análise em *multilocus* de repetições em *tandem* de número variável (MLVA) de linhagens vacinais B19 e RB51 de *Brucella abortus* via / Ana Paula Paiva de Faria; orientação de Ricardo Titze de Almeida – Brasília, 2010. 39 p:II.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010.

1. Brucelose 2. Vacina B19 3. Vacina RB51 e 4. MLVA (análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável). I. FARIA, A. P. P. II. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado tanto crescimento pessoal e profissional.

À minha família por ter acreditado em mim, ter me apoiado, me estimulado e me amparado, principalmente no momento mais difícil pra mim. Obrigada, mamãe, papai, Claudio e Marcos. Amo vocês.

Aos meus sobrinhos por me trazerem tanta felicidade e me fazerem ver que muita coisa boa ainda existe neste mundo. Muita alegria proporcionada. Amo vocês.

Agradecimento especial ao meu querido orientador, Ricardo Titze de Almeida, à amiga e professora Simone Perecmanis, ao professor Vitor Salvador Picão Gonçalves e ao professor Andrey Pereira Lage, por todo o apoio, carinho, paciência, dedicação e aprendizado a mim dispensados.

Aos meus queridos amigos, Cecil, Xandinha, Maria, Gabi, Aninha, Lusinha, Dé, Cellinha, Carol, Nanda, Lorena, Mari, Martinha, Diego e Júnior por todo o cuidado, companheirismo, carinho e amizade. Aos colegas e amigos da pós e dos laboratórios do Hvetinho, muito obrigada. Vocês todos foram essenciais nesse período de minha vida.

Aos meus companheiros em BH, Rebequinha, Ju, Telminha, Elaine, Mona, Ana Paula, Giovanna, Alessandro e Le. Obrigada por participarem de um momento tão delicado de minha vida, e por terem me apoiado quando foi preciso. Tive muita sorte de conhecê-los e conviver com vocês.

Agradeço também à FAPDF pelo apoio financeiro e ao LANAGRO de Pedro Leopoldo pela disponibilidade em nos ajudar, fornecendo as vacinas e o apoio necessário para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|---|--------|
| PREFÁCIO | vii |
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| CAPÍTULO I | |
| Introdução | 10 |
| Referencial Teórico..... | 11 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| REFERÊNCIAS..... | 18 |
| CAPÍTULO II..... | |
| Artigo – Variabilidade e estabilidade genética de linhagens vacinais B19 e RB51 de <i>Brucella abortus</i> via análise em <i>multi locus</i> das repetições em <i>tandem</i> de número variável – MLVA..... | 22 |
| CAPÍTULO III | |
| Considerações finais..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| SIGLA / ABREVIATURA | NOMENCLATURA |
|---------------------|---|
| bv. | Biovariedade |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleotídeo |
| EUA | Estados Unidos da América |
| LANAGRO | Laboratório Nacional Agropecuário |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MLVA | <i>Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis</i> |
| PCR | Reação de Polimerização em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PNCEBT | Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal |
| SSR | <i>Short sequence repeats</i> |
| STR | <i>Short tandem repeats</i> |
| USDA | <i>United States Department of Agriculture</i> |
| VNTR | <i>Variable Number of Tandem Repeat</i> |

PREFÁCIO

A brucelose é doença bacteriana zoonótica difundida em todo o mundo. Afeta grande variedade de espécies de mamíferos, inclusive animais silvestres. Diversos países já adotaram programas de controle e erradicação da doença, devido aos sérios prejuízos econômicos e à saúde pública. Além disso, a *Brucella* é considerada potencial agente de bioterrorismo. Várias técnicas já foram empregadas para a análise da variabilidade de tais microrganismos. Entre as técnicas moleculares, tem sido empregada a análise em *multilocus* de repetições em *tandem* de número variável - MLVA (*multiple locus variable number tandem repeat analysis*). Esta técnica é sensível, rápida e específica, podendo ser utilizada para análise de variabilidade genética de microrganismos em determinado local, inclusive das linhagens vacinais. O presente estudo avaliou a variabilidade e estabilidade genética de linhagens vacinais de *Brucella abortus* presentes nas vacinas B19 e RB51, visando propor a utilização do método MLVA como teste adicional no controle de vacinas comerciais contra brucelose.

RESUMO

O atual estudo objetivou analisar a variabilidade genética de linhagens vacinais de *Brucella*, avaliando ainda os efeitos de repiques sucessivos sobre as mesmas. Trata-se de doença zoonótica de alcance mundial e que causa prejuízos econômicos na produção animal e danos à saúde pública. Visando controlar a doença, foi instituído o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal em 2001, que inclui a vacinação de fêmeas. Quanto à avaliação genética de linhagens vacinais, a técnica de análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável - MLVA permite identificar a variabilidade genética microbiana de forma acurada, identificando-se genogrupos de isolados. O atual estudo analisou 63 amostras de linhagens vacinais B19 (n=53) e RB51 (n=10), provenientes de sete laboratórios brasileiros. Também foi avaliado o efeito de sucessivos repiques sobre o genoma microbiano. Desta forma, foram identificados quatro genogrupos distintos. No genogrupo I foram agrupadas as 10 amostras de B19 do laboratório G e seus 10 repiques. Quarenta e três amostras de B19 dos laboratórios A, B, D, E, F, H, bem como os 10 repiques das amostras E e da cepa de referência S (USDA) foram agrupadas no genogrupo II. O genogrupo III foi composto pelas amostras vacinais de RB51 do laboratório Y e pelos 10 repiques da linhagem Y1. Finalmente, o genogrupo IV incluiu oito amostras vacinais de RB51 e os 10 repiques das amostras X1 e da cepa de referência Schurig. As linhagens vacinais B19 e RB51 derivaram de ramificações genéticas distintas que formaram, cada qual, dois genogrupos, com divergência apenas nos *loci* Bruce07 e Bruce43. Concluindo, a técnica de MLVA mostrou adequada capacidade discriminatória, podendo ser utilizada para análises de qualidade na produção de vacinas comerciais em nosso País. Foi observado, ainda, que 10 passagens sucessivas não afetam os *loci* avaliados.

Palavras-chave: Brucelose, *Brucella abortus*, vacinas, *tandem repeats*, MLVA.

ABSTRACT

The present study was aimed to analyze the genetic variability among *Brucella abortus* lineages present in commercial vaccines from Brazilian laboratories. The brucellosis is a worldwide distributed zoonotic disease. The disease may affect the livestock production as well as the human health. To control the spread of Brucellosis in Brazil, our country established the National Program for Controlling and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis – PNCEBT which included the vaccination of female bovines. The multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) is a rapid and accurate method used to access the genetic variability among microbial isolates and to discriminate groups of genetically-related isolates. We used a previously described 16 *loci* MLVA method to analyze a sample composed by B19 vaccines (n=53) and RB51 vaccines (n=10) from seven Brazilian laboratories. The genetic variability after 10 successive cultures was also accessed. We identified four distinct genogroups of isolates. The genogroup I contained ten B19 samples from the laboratory G and their respective successive cultures. Forty-three B19 samples of the laboratories A, B, D, E, F, and H as well as the successive cultures of the reference S (USDA) strain and the commercial strain E, were all clustered into the genogroup II. The genogroup III included the RB51 laboratory Y's samples and the Y1's successive cultures. Finally, eight RB51 samples, the successive X1's cultures, and the reference Schurig strain, were clustered into the genogroup IV. Our results revealed that the B19 and RB51 lineages derived from two distinct genetic branches that diverged in the locus Bruce07 and Bruce43. In conclusion, the MLVA showed accurate discriminatory results and would be used in future evaluations of the commercial vaccines of Brucellosis. The results of our study also showed that ten successive cultures were not able to generate genetic variability into the *loci* studied.

Keywords: Brucellosis, *Brucella abortus*, vaccines, *tandem* repeats, MLVA.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Brucelose é doença de natureza zoonótica, identificada em várias regiões do mundo e que pode afetar diversas espécies de mamíferos. A doença é provocada por microrganismos do gênero *Brucella*, que compreende onze espécies, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* e *B. microti* (ICSP, 2009, Maquart et al., 2009). Duas novas espécies foram isoladas de humano. Uma foi isolada a partir de um implante de seio de uma idosa de 71 anos, a B01T, sendo proposto o nome de *Brucella inopinata* (Scholz et al., 2009). A segunda foi isolada em uma biópsia de pulmão de um homem de 52 anos, a BO2 (Tiller et al., 2010).

Quanto à questão zoonótica, humanos podem se infectar com a bactéria por ingestão de leite e derivados não pasteurizados, inalação de aerossóis contaminados, por manipulação do microrganismo em laboratórios ou lesões de continuidade. Os sinais clínicos são inespecíficos, incluindo febre recorrente e bacteremia, além de infecções de tecidos linforeticulares (Stoffregen et al., 2007).

No plano econômico, a brucelose é responsável por sérios prejuízos na produção animal. A doença pode causar o nascimento de bezerros fracos, perdas reprodutivas (aborto, repetição de cio), esterilidade, lesões piogranulomatosas em tecidos (articulações, tendões) e diminuição na produção de carne e leite (Stoffregen et al., 2007).

Levando-se em conta a importância econômica e sanitária da doença, diversos países adotaram programas de controle e erradicação da brucelose bovina (Nishi et al., 2002, Rivera et al., 2002, Portugal, 2009). Mesmo em países onde a erradicação já ocorreu, deve-se manter a vigilância epidemiológica, evitando a reintrodução da doença. Assim, uma das principais medidas a serem implementadas nestes programas é a vacinação em massa de animais (Miranda, 2009). Dessa forma, o Programa Nacional de Erradicação e Controle da Brucelose e da

Tuberculose Animal (PNCEBT) determina a vacinação obrigatória das fêmeas entre três e oito meses de idade com a vacina atenuada da linhagem B19. Esse programa cita ainda a possibilidade de uso da vacina atenuada da linhagem RB51 em determinadas ocasiões, de acordo com a Instrução Normativa nº 33, de 24 de agosto de 2007 (Brasil, 2007).

O controle de qualidade na produção das vacinas deve ser realizado periodicamente, conforme determina o PNCEBT. No entanto, não são realizadas rotineiramente análises de variabilidade genética dos lotes vacinais. Tal caracterização genética das linhagens vacinais poderia ser realizada por análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável (MLVA) (García-Yoldi et al., 2007).

Com base no exposto, pode-se considerar de grande importância a realização de estudos para avaliar eventuais mudanças no genoma de linhagens vacinais de *Brucella* spp. Portanto, a avaliação da estabilidade genética de vacinas comerciais de *Brucella abortus* produzidas com as amostras B19 e RB5 no Brasil e a investigação da potencialidade da MLVA-16 como ferramenta no controle de qualidade de vacinas atenuadas contra a brucelose são aspectos relevantes a serem estudados.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Zoonose

A brucelose é doença zoonótica amplamente distribuída pelo mundo, sendo considerada um problema de saúde pública (Corbel, 2006). Os relatos em nível mundial são da ordem de 500.000 casos anuais de infecção humana. Apenas nos Estados Unidos da América (EUA) são relatados de 50 a 100 casos por ano (Pappas et al., 2006). Além disso, a brucelose causa prejuízos econômicos devido a perdas relacionadas à reprodução e à contaminação dos produtos de origem animal. Também podem ocorrer restrições ao comércio internacional. Estudos anteriores mostram que as perdas relacionadas à brucelose bovina no Brasil podem atingir 32 milhões de dólares anuais (Brasil, 1977).

2. O microrganismo

A bactéria *Brucella* é microrganismo Gram-negativo, imóvel e aeróbica. Apresenta dimensão reduzida (0,6 a 1,5 µm), sendo intracelular facultativo, multiplicando-se em macrófagos. O pH ideal para seu crescimento varia de 6,6 a 7,4. As colônias podem ser rugosas (*B. ovis* e *B. canis*) ou lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* e *B. microti*, B01T - *B. inopinata* e BO2). Quanto à morfologia das colônias lisas, estas são circulares, convexas, opacas, brancas e brilhosas. Já as rugosas têm aparência seca granular e cor branco-amarelada; as colônias mucóides podem ser transparentes ou cinzas, e são mais opacas e granulares em relação às lisas. As colônias raramente são pleomórficas. A bactéria pode sobreviver em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e que contenha matéria orgânica (Quinn et al., 2005).

O microrganismo é considerado pertencente ao grupo de risco 3, já que é potencialmente transmitido por aerossóis e em alguns casos pode levar à infecção letal. Portanto, qualquer manipulação laboratorial deve ser realizada em laboratório nível 3 de biossegurança (Lecároz et al., 2006).

A taxonomia do gênero *Brucella* é controversa, particularmente quanto à questão de ser um gênero formado por uma única espécie com vários biovars (bvs.) ou, ao contrário, ser composto por várias espécies biológicas diferentes. Inicialmente, o gênero foi dividido em seis espécies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis* e *B. neotomae*, com base nas diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro e características bioquímicas e de crescimento (Osterman e Moriyón, 2006). Posteriormente, estudos genéticos de taxonomia demonstraram haver alta similaridade genética entre as espécies, acima de 90% de homologia do DNA. Assim, foi proposto que o gênero seria composto de uma única espécie, *B. melitensis*, sendo esta dividida em biovars correspondentes às espécies anteriormente descritas (Verger et al., 1985). No entanto, essa proposta ainda não foi aceita pelo *Taxonomy Subcommittee do International Committee on Systematic Bacteriology* (OIE, 2004). Comumente utiliza-se a taxonomia que divide o gênero nas várias espécies.

Os microrganismos causadores da doença em mamíferos terrestres e respectivos hospedeiros preferenciais são *Brucella abortus* (bovinos), *B. suis* (suídeos), *B. canis* (canídeos), *B. ovis* (ovinos), *B. melitensis* (caprinos) e *B. neotomae* (ratos do deserto de Utah, EUA). Existem ainda espécies isoladas de

mamíferos marinhos, como a *B. ceti*, a *B. pinnipedialis* e ainda a *B. microti*, isolada da espécie de roedor *Microtus arvalis* (Maquart et al., 2009, Scholz et al., 2008). Duas novas espécies foram isoladas de humano, a B01T, sendo proposto o nome de *Brucella inopinata* e a BO2 (Scholz et al., 2009, Tiller et al., 2010).

3. Brucelose humana

A brucelose é endêmica em várias regiões do mundo, principalmente no Mediterrâneo, Oeste Asiático, América do Sul e partes da África (Corbel 1997, Memish e Balkhy, 2004). No entanto, no Brasil foram descritas apenas *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* e *B. ovis* (Poester et al., 2002).

A brucelose humana também está amplamente difundida, apresentando letalidade em 1 a 6 % dos casos não tratados (Couto apud Mello, 2007). Em humanos, os principais causadores da doença são: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis* e, principalmente, *B. melitensis*. As formas de contaminação incluem a ingestão de leite e derivados não pasteurizados, a inalação de aerossóis contaminados, a manipulação do microrganismo em laboratórios e lesões de continuidade contaminadas pelo manuseio de carnes contaminadas (Godfroid et al., 2005). Em países onde a doença foi erradicada, a infecção pode ocorrer pela exposição acidental em laboratórios, pelo contato com animais silvestres infectados ou, ainda, em decorrência de viagens para áreas endêmicas (Kattar et al., 2007). A doença em humanos ocorre mediante a infecção crônica debilitante, apresentando quadro clínico com febre recorrente, infecção de tecidos linforeticulares, bacteremia, lesões purulentas e piogranulomatosas em múltiplos órgãos, artrite, espondilite, endocardite, meningite e abscessos hepato-esplênicos levando à baixa mortalidade (Plommet et al., 1998, Xavier et al., 2009). O tratamento antimicrobiano é feito via associação de doxiciclina a um segundo antibiótico, como gentamicina, tetraciclina, estreptomicina ou rifampicina (Maas et al., 2007). A prevenção depende do controle da doença nos rebanhos (Corbel, 1997).

4. Brucelose nos animais

No que se refere aos animais, a forma de disseminação mais comum da brucelose é a oral, por meio do contato com feto abortado e outros tecidos contaminados, podendo também ocorrer a infecção via coito, principalmente em suínos. A sintomatologia consiste em perdas reprodutivas, aborto, nascimento de

crias fracas, esterilidade, lesões piogranulomatosas em tecidos e diminuição na produção de carne e leite (Stoffregen et al., 2007). Após a fase aguda, a bactéria pode ser encontrada em linfonodos supramamários (Gupta et al., 2006; Ilhan et al., 2008) e glândula mamária em 80% dos animais infectados, sendo que estes continuam secretando o microrganismo pelos fluidos corporais, como o leite (Ilhan et al., 2008). No caso da doença em bovinos e bubalinos, o abate sanitário deve ser realizado conforme estabelece o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2006).

4.1. Brucelose bovina

O principal agente etiológico da brucelose bovina é a *B. abortus* biovariedade (bv.) 1. No estudo de Minharro (2009), realizado no Brasil, essa bv. foi encontrada em 67,1% das 137 amostras estudadas. No entanto podem ainda ser encontradas as biovariedades 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, sendo que as duas últimas e a 5 ainda não foram identificadas no Brasil.

Algumas espécies de *Brucella* são classificadas como armas biológicas, sendo consideradas potenciais agentes de bioterrorismo desde 1954 (ASM, 2004). A instituição americana “*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*” considera o gênero *Brucella* como pertencente à lista B de biodefesa, que corresponde ao grupo de segunda ordem de prioridade como agente de bioterrorismo (CDC, 2007).

4.1.1. Métodos de diagnóstico

Considerando-se a importância sanitária e econômica das bruceloses, vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos. Os três métodos de diagnóstico frequentemente utilizados são: 1. o isolamento do microrganismo em leite ou em órgãos de animais que apresentaram a doença; 2. detecção de anticorpos de *Brucella* em soro sanguíneo ou leite e; 3. detecção da bactéria por técnicas de biologia molecular.

O isolamento ainda é considerado o padrão-ouro, apesar de ser um método demorado, levando-se cerca de 14 dias para conclusão do diagnóstico laboratorial. A detecção de anticorpos é o método mais rápido, no entanto pode apresentar reações cruzadas com outros microrganismos. Já os testes por biologia molecular são altamente específicos e sensíveis. Foram descritos vários protocolos de PCR

(Reação de Polimerização em Cadeia - PCR) que detectam o microrganismo em secreções, em órgãos de interesse e até mesmo em vacinas (Bricker e Halling, 1994, Bricker e Halling, 1995, Romero e Lopez-Goñi, 1999, Bricker et al., 2003, Gupta et al., 2006, O'Leary et al., 2006, López-Goñi et al., 2008).

4.1.2. Programas de controle

A maioria dos países, incluindo o Brasil, considera a brucelose doença de notificação obrigatória. Grande parte dos países já possui um programa de erradicação da doença. Para tanto, é necessária a identificação individual de cada animal, controle do movimento dos animais, vacinação compulsória e o monitoramento do rebanho pela sorologia (Brasil, 2006). Mesmo em países onde ocorreu a erradicação da brucelose, é importante manter-se a vigilância epidemiológica, evitando a reintrodução da doença. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em 2001, pelo MAPA.

Este programa adota medidas preventivas, de fiscalização e de controle do trânsito de animais. O controle da doença inclui diagnóstico, abate e vacinação (Brasil, 2006). Essa última é considerada a parte mais importante em um programa de controle da brucelose. O PNCEBT tornou obrigatória a vacinação de fêmeas entre 3 e 8 meses de idade com a vacina B19. Além disso, determinou a possibilidade de vacinação de fêmeas adultas com a vacina RB51 em situações específicas.

4.1.2.1. A vacinação

A vacinação dos animais deve respeitar as normas existentes no PNCEBT. O controle de qualidade das vacinas deve ser feito de forma cuidadosa, observando-se os padrões estabelecidos. Assim, o sucesso do programa depende da qualidade da vacina utilizada e sabe-se que o Brasil é capaz de produzir vacinas com padrão internacional e em quantidade suficiente para combater a doença no País (Miranda, 2009, Poester et al., 2002).

As amostras vacinais B19 e RB51 podem infectar humanos, já que são vacinas atenuadas. A colônia de *Brucella* da vacina RB51 é rugosa, apesar de ser derivada de uma cepa lisa, a *Brucella abortus* 2308, resistente à rifampicina (Schurig et al., 2002). Já a colônia da vacina B19 é lisa, e deve ser preparada a partir de

amostra oriunda de laboratórios de referência como o do USDA, devendo possuir as características da cepa B19 original, que é uma *Brucella abortus* bv. 1 (OIE, 2004). A vacina B19 tem sido utilizada como prevenção em diversos países devido à baixa e estável patogenicidade e à alta antigenicidade e imunogenicidade (Poester, 2006). Deve-se checar a pureza (ausência de microrganismos estranhos), viabilidade (bactérias vivas por dose) e determinação da fase dissociativa da vacina B19. Além disso, a produção da vacina deve ser regularmente testada para virulência residual, avaliação da estabilidade térmica, imunogenicidade em ratos, característica lisa/rugosa, ausência de contaminação, pH e umidade (Brasil, 2004, OIE 2004). Para a produção da vacina, deve ser utilizada uma cepa de referência de *B. abortus* B19 reconhecida pelo MAPA, com eficácia comprovada (Brasil, 2004).

4.1.2.1.2. Avaliação genética das linhagens vacinais

A avaliação da estabilidade genética também pode ser realizada para avaliação da homogeneidade dos lotes vacinais (García-Yoldi, 2007). Uma das formas de caracterizar as linhagens vacinais pode ser obtida mediante a análise de regiões de mini e microsátélites, em particular para amostras isoladas de lotes vacinais de B19 e RB51. Minisatélites ou SSR (*short sequence repeats*) são sequências genômicas que contém de 6 a 100 pares de bases (Vergrnaud e Denoeud, 2000). Microsatélites são também denominados STR (*short tandem repeats*) e consistem de sequências de 1 a 25 nucleotídeos (Titze-de-Almeida, 2004).

O polimorfismo dessas regiões é denominado *variable number of tandem repeats* (VNTRs). Repetições em *tandem* são cópias de uma unidade elementar, sendo que vários alelos podem ser observados em diferentes cepas bacterianas (Al Dahouk et al., 2007). Devido ao seu polimorfismo, os VNTRs têm sido utilizados como marcadores moleculares para genotipagem de diversas espécies (Chang et al., 2006). Regiões de repetição em *tandem* estão relacionadas a funções reguladoras em eucariotos, embora a grande maioria ainda permaneça com funções desconhecidas (Belkum et al., 1998, Cesar, 2008). Há evidências de que as regiões de SSR são mais suscetíveis a eventos mutagênicos e podem estar relacionados a doenças (Belkum et al., 1998).

Com o sequenciamento de genomas bacterianos, ficou evidente que microrganismos contêm um número considerável de regiões de repetição. Tais

repetições podem ser alvos de eventos genômicos como recombinação do DNA ou erro na sua duplicação (“slippage”). A técnica de análise dessas regiões de repetição, denominada MLVA (*Multiple locus variable number tandem repeats analysis*), permite caracterizar a variabilidade genética, sendo de especial utilidade em espécies altamente monomórficas, como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* e *Brucella* spp. (Lindstedt, 2005, Le Flèche et al. 2006, Whatmore et al., 2006). A MLVA não necessita de manipulação do microrganismo vivo, não apresenta alto custo, permite a genotipagem, é relativamente simples, rápida e permite comparar resultados digitais entre os laboratórios (Vergnaud e Pourcel, 2006, Whatmore et al., 2006). Além disto, o uso de múltiplos *loci* aumenta a capacidade discriminatória, comparada à capacidade obtida quando utilizado apenas um alvo genético (Whatmore et al., 2006).

Recentemente, foi proposto o ensaio denominado MLVA-16 para análise de variabilidade genética de *Brucella abortus*, compreendendo 16 (dezesseis) marcadores moleculares. Oito destes são minisatélites capazes de diferenciar as espécies de *Brucella* spp. Os demais, denominados microsátélites, apresentam maior grau de variabilidade das seqüências repetitivas, permitindo discriminação intra-específica (Le Flèche et al., 2006, Al Dahouk et al., 2007). García-Yoldi e colaboradores (2007) sugerem o uso deste método de MLVA para garantir a qualidade e estabilidade de vacinas vivas bacterianas e também sugerem o uso da MLVA para o controle *in vitro* na análise de vacinas.

Neste sentido, a técnica MLVA-16 pode ser empregada em programas de controle e vigilância epidemiológica, assim como na análise genética de linhagens vacinais.

OBJETIVOS

- Avaliar a estabilidade genética das vacinas comerciais anti-*Brucella abortus* produzidas no Brasil e que utilizam cepas de referência B19 e RB51;
- Avaliar a identidade das linhagens vacinais em relação à semente original (“original seed”);
- Investigar o potencial da MLVA-16 como ferramenta no controle de qualidade de vacinas atenuadas contra a brucelose bovina.

REFERÊNCIAS

- AL DAHOUK, S., LE FLÈCHE, P., NÖCKLER, K., JACQUES, I., GRAYON, M., SCHOLZ, H. C., TOMASO, H., VERGNAUD, G., NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 137-145, 2007.
- ASM (American Society for Microbiology). **Sentinel Laboratory Guidelines for suspected agents of bioterrorism. *Brucella* species**, October 2004
- BELKUM, A. VAN, SCHERER, S., ALPHEN, L. VAN, VERGBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 2, p. 275-293, 1998.
- BRASIL, 2004. Instrução Normativa nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. Regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 fev. 2004. Seção 1, p. 2.
- BRASIL, 2007. Instrução Normativa nº 33, de 24 de agosto de 2007. Regulamento técnico para a produção e controle de qualidade da vacina contra brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 28 ago. 2007. Seção 1, p. 6.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 1977. **Diagnóstico de Saúde Animal**, p. 525-602.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 184 p. (Manual Técnico), 2006.
- BRICKER, B. J., EWALT, D.R., HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, 2003.
- BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology** v. 32, 2660– 2666. 1994.
- BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, 1640–1642 1995.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Bioterrorism**. Disponível em: <<http://www.bt.cdc.gov/bioterrorism>>. Acesso em: 23 novembro 2007.
- CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no hospital veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição**. Brasília: UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal).
- CHANG, C-H, CHANG Y-C, UNDERWOOD, A., CHIOU, C-S. VNTRDB:a bacterial variable number tandem repeat locus database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.D416-D421, 2006
- CORBEL, M.J. Brucellosis in humans and animals. **World Health Organization**, 2006.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: An overview. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p. 213-221, 1997.
- GARCÍA-YOLDI, D., LE FLÈCHE, P., MARÍN, C. M., DE MIGUEL, M. J., MUÑOZ, P. M., VERGNAUD, G., LÓPEZ-GOÑI, O. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-

- number tandem repeat analysis. **Vaccine**, p. 2858-2862, 2007.
- GODFROID, J., CLOECKAERT, A., LIAUTARD, J., KOHLER, S., FRETIN, D., WALRAVENS, K., GARIN-BASTUJI, B., LETESSON, J. From the discovery of Malta fever's agent to the discovery of marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v. 36, p. 313-326, 2005.
- GUPTA, V. K., VERMA, D. K., SINGH, K., KUMARI, R., SINGH, S. V., VIHAN, V. S. Single-step PCR for detection of *Brucella melitensis* from tissue and blood of goats. **Small Ruminant Research**, v. 66, p. 169-174, 2006.
- ICSP - **International Committee on Systematics of Prokaryotes**. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Disponível em: www.the-icsp.org. Acesso em: 18 mar 2009.
- ILHAN, Z., AKSAKAL, A., EKIN, I. H., GÜLHAN, T., SOLMAZ, H., ERDENLIG, S.. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 301-306, 2008.
- KATTAR, M. M., ZALLOUA, P. A., ARAJ, G. F., SAMAHA-KGOURY, J., SHBAKLO, H., KANJ, S. S., KHALIFE, S., DEEB, M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 23-32, 2007.
- LE FLECHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON P., DENOEUDE, F., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A., VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat *Loci* for a *Brucella* MLVA typing assay. **BioMed Central Microbiology**, v. 6, n. 9, 2006.
- LECÁROZ, C., BLANCO-PRIETO, M. J., BURRELL, M. A., GAMAZO, C. Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 549-556, 2006.
- LINDSTEDT, B-A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2567-2582, 2005.
- LÓPEZ-GOÑI, I., GARCÍA-YOLDI, D., MARÍN, C. M., MIGUEL, M., J., MUÑOZ, P. M., BLASCO, J. M., JACQUES, I., GRAYON, M., CLOECKAERT, A., FERREIRA, A. C., CARDOSO, R., CORRÊA DE SÁ, M. I., WALRAVENS, K., ALBERT, D., GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a multiples PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3484-3487, 2008.
- MAAS, K. S. J. S, MÉNDEZ, M., ZAVALETA, M., MANRIQUE, J., FRANCO, M. P., MULDER, M., BONIFÁCIO, N., CASTAÑEDA, M. L., CHACALTANA, J., YAGUI, E. GILMAN, R. I., GUILLEN, A., BLAZES D. L., ESPINOSA, B., HALL, E., ABDOEL, T., SMITS, H. The brucellosis working group in Callao. **American Journal Tropical Medicine Hygienization**, v. 76, nº 4, p. 698-702, 2007.
- MAQUART, M., LE FLÈCHE, P., FOSTER, G., TRYLAND, M., RAMISSE, F., DJONNE, B., AL DAHOUK, S., JACQUES, I., NEUBAUER, H., WALRAVENS, K., GODFROID, J., CLOECKAERT, 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*. **BioMed Central Microbiology**, v. 9, 145, 2009.

- MELLO, C. C. F., SOUZA, D. U., GLÓRIA, F. A. C., MOURA, L. O., MELLO, G. C. F. Espondilodiscite por brucelose: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 40, p.469-472, 2007
- MEMISH, Z. A., BALKHY, H. H. Brucellosis and International Travel. **J. Travel Med.**, v. 11, p. 49-55, 2004.
- MINHARRO, S. 2009 **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2009. 77 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- MIRANDA, K. L. 2009 **Evaluation of brucellosis vaccines in Brazil**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2009. 77 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- NISHI, J. S., STEPHEN, C., ELKIN, B. T. Implications of agriculture and wildlife policy of management and eradication of bovine tuberculosis and brucellosis in free-ranging wood bison of northern Canada. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 969, p. 236-244, 2002
- O'LEARY, S., SHEAHAN, M., SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 170-176, 2006.
- OIE – Organização Internacional e Epizootias. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, chapter 2.3.1 – Bovine Brucellosis. 5ª edição, 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm>. Acesso em: 01 outubro 2009.
- OSTERMAN, B., MORIYÓN, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella* Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1173–1175, 2006.
- PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., AKRITIDIS, N., CHRISTOU, L., TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, vol. 6, p. 91–99, 2006.
- PLOMMET M., DIAZ R., VERGER J.M. **Brucellosis**. In Zoonoses. Eds, SR Palmer, L Soulsby and DIH Simpson. Oxford: Oxford University Press, p. 23-35, 1998.
- POESTER, F. P. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2006. 52 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S. P., LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S. P., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L., OLSEN, S. C., SCHURIG, G. G., LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, p. 5327-5334, 2006.
- PORTUGAL, 2009. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. **Programa de erradicação da brucelose dos bovinos**. Disponível em: <<http://www.dgv.min-agricultura.pt>>. Acesso em: 20 março 2010.
- QUINN, P.J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W. J., LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Editora Artmed, 2005.
- RIVERA, S. A., RAMÍREZ, M. C. LOPETEGUI, P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 45-53, 2002.
- ROMERO, C., LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial

- DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.
- SCHOLZ, H. C., HUBALEK, Z., SEDLÁČEK, I., VERGNAUD, G., TOMASO, H., DAHOUK, S. A., MELZER, F., KÄMPFER, P., NEUBAUER, H., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M. S., WHATMORE, A. M., FALSEN, E., BAHN, P., GÖLLNER, C., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J., NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375-382, 2008.
- SCHOLZ, H. C., NÖCKLER, K., GÖLLNER, C., BAHN, P., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL-DAHOUK, S., KÄMPFER, P., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M. S., WHATMORE, A. M., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J., KUMAR, B. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, published online ahead of print on 6 August 2009 as doi:10.111148-09/ijms.0.011148-0.
- SCHURIG, G. G., SRIRANGANATHAN, N., CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 479-496, 2002.
- STOFFREGEN, W. C., OLSEN, S. C., WHEELER, C. J., BRICKER, B. J., PALMER, M. V., JENSEN, A. E., HALLING, S. M., ALT, D. P. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 227-237, 2007.
- TILLER, R. V., GEE, J. E., LONSWAY, D. R., GRIBBLE, S., BELL, S. C., JENNISON, A. V., BATES, J., COULTER, C., HOFFMASTER, A. R., De, B. K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, 23, 2010.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R. **Caracterização da resistência microbiana, virulência e variabilidade genética de enterococos**. Brasília, UnB, Faculdade de Medicina, 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)
- VERGER, J. M., GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D., GRAYON, M. *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 292-295, 1985.
- VERGNAUD, G., DENOEUD, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. **Genome Research**, v. 10., p. 899-907, 2000.
- VERGNAUD, G., POURCEL, C. Multiple Locus VNTR (variable Number of Tandem Repeat) Analysis. **Molecular identification, systematics and population structure of prokaryotes**, E. Stackebrandt, Springer, 2006.
- WHATMORE, A. M., SHANKSTER, S. J., PERRET, L. L., MURPHY, T. J., BREW, S. D., THIRLWALL, R. E., CUTLER, S. J., MACMILLAN, A. P. Identification and characterization of variable-number of tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1982-1993, 2006.
- XAVIER, M. N., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, v. 39, n.7, 2009.

CAPÍTULO II

ARTIGO

VARIABILIDADE E ESTABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS VACINAIS B19 E RB51 DE *BRUCELLA ABORTUS* VIA ANÁLISE EM *MULTI LOCUS* DE REPETIÇÕES EM *TANDEM* DE NÚMERO VARIÁVEL - MLVA

Ana Paula P. de Faria^{a*}; Elaine M. S. Dorneles^{b*}; Rebeca B. Pauletti^b; George A. V. Caldeira^c; Ricardo Títze-de-Almeida^a; Andrey P. Lage^b

^a Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

^b Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

^c Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

* Os dois autores contribuíram igualmente para o estudo.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Brucella* são responsáveis por infecções zoonóticas de importância mundial. A brucelose é transmitida ao homem por diversas formas, sendo a principal a ingestão de leite e produtos lácteos não pasteurizados. A infecção por *Brucella* spp pode afetar diversos tecidos, causando febre recorrente, bacteremia, baixa mortalidade, entre outros (Stoffregen et al., 2007).

A doença nos animais resulta em aborto, queda na produção de leite e de carne, esterilidade, perdas reprodutivas e lesões piogranulomatosas, causando assim, prejuízos à economia e à saúde pública (Stoffregen et al., 2007).

Mesmo em países onde a doença foi erradicada, programas de vigilância são necessários para evitar a reintrodução da doença. A vacinação é fundamental em programas de controle. Assim, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) tornou obrigatória a vacinação de

fêmeas entre três e oito meses de idade com a vacina B19 (Brasil, 2006). Dessa forma, o sucesso desses programas depende de um adequado controle de qualidade na produção das vacinas utilizadas. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina normas a serem verificadas na fabricação das vacinas B19, como a pureza e viabilidade da vacina (Brasil, 2004).

Para caracterização genética de linhagens vacinais, pode ser utilizada a técnica da análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável (MLVA), que permite avaliar a variabilidade genética de microrganismos. Algumas vantagens dessa técnica incluem o custo razoável, a não necessidade de manipulação do microrganismo vivo e a possibilidade de realização de genotipagem (Vergnaud e Pourcel, 2006).

Os objetivos desse estudo foram avaliar a estabilidade genética das vacinas comerciais para *Brucella abortus* produzidas no Brasil em relação às cepas de referência B19 e RB51, além de investigar o potencial do MLVA-16 como ferramenta no controle de qualidade de vacinas atenuadas contra a brucelose bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens vacinais e condições de cultivo

O presente estudo analisou 53 amostras da vacina B19 e 10 amostras da vacina RB51, além de amostras controle de B19 (“original seed”) e RB51. Também foi utilizada a amostra 16M, como marcador molecular. A amostra B19 foi obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, Ames, Iowa, USA) e a RB51 foi fornecida pelo Prof. Gerhardt G. Schurig (Virginia Tech University, Blacksburg, VA, USA). Já a amostra 16 M foi isolada na América do Sul, proveniente do LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário – MAPA, Pedro Leopoldo, MG, Brasil).

As amostras vacinais analisadas (n=63) foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. O fornecimento das vacinas ocorreu após análise, no próprio LANAGRO, de pureza, dissociação, contagem de microrganismos viáveis, pH e umidade das linhagens

vacinais e diluente e pressão negativa do frasco (Brasil, 2004). Os lotes vacinais foram produzidos entre 2006 e 2008, por sete laboratórios, sendo que dois desses também produziam RB51. Os laboratórios foram denominados A, B, D, E, F, G e H para vacinas B19, de acordo com Miranda (2009), e para as vacinas RB51, X e Y. O número de partidas variou de acordo com o laboratório: A (n = 9), B (n = 2), D (n = 10), E (n = 10), F (n = 4), G (n = 10), H (n = 8), X (n = 8) e Y (n = 2).

O primeiro passo após a chegada das vacinas foi realizado no laboratório de nível 3 (três) de biossegurança da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As vacinas liofilizadas foram diluídas com o diluente recomendado pelo fabricante. As vacinas foram inoculadas em ágar triptose (Difco, USA) e então incubadas em estufa a 37°C com 5% de gás carbônico por 48 h. Após o crescimento, as colônias das amostras vacinais foram colocadas em microtubos com PBS 1X e, em seguida, centrifugadas a 22.000 xG por 5 min. O passo seguinte consistiu em descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 100 µL de tampão TE (Tris-ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM). Posteriormente essa solução foi inativada a 85°C por 2 h.

Após a inativação, já em laboratório nível 2 (dois) de biossegurança, foi realizada a extração de DNA pelo método do isotiocianato de guanidina (Pitcher et al., 1989). Em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro e a padronização da dosagem de DNA para 50 ng/µL em cada amostra vacinal.

Os DNAs extraídos foram utilizados na reação de MLVA, de acordo com Le Flèche et al., (2006), para definição do perfil genotípico.

Além do estudo da variabilidade e estabilidade genética dos lotes vacinais, foram também realizados 10 sucessivos repiques para análise de eventuais mutações relativas à multiplicação microbiana em duas amostras vacinais de B19 e duas amostras vacinais de RB51, de quatro laboratórios distintos. Repiques sucessivos também foram realizados nas amostras de referência B19 - USDA (S) e RB51 - Schurig (R).

Variabilidade genética e genotipagem das amostras vacinais

A caracterização da variabilidade genética das linhagens vacinais foi realizada pela técnica MLVA-16, descrita por Le Flèche et al. (2006). Os iniciadores (*primers*) utilizados foram classificados em dois painéis, 1 e 2. No painel 1 encontram-se 8

(oito) minisatélites correspondentes aos *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55. O painel 2 corresponde a 8 microsátélites, dividido em dois grupos: 2A (Bruce18, Bruce19 Bruce21) e 2B (Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce30) (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12 µL contendo tampão 1X (50 mM Tris, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,3) (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil); 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen; Carlsbad, CA, USDA); 1 µM de cada iniciador (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA); 1 unidade de Taq DNA polimerase (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil) e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. As amplificações foram realizadas (Thermo Scientific Hybaid Thermal Cycler) usando desnaturação inicial a 96° C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% ou a 3%, para mini e microsátélites, respectivamente, corado com brometo de etídeo a 0,5 mg/mL. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-borato-EDTA 1X (TBE – pH 8,3), sendo o resultado visualizado e fotografado (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) no transiluminador de luz ultravioleta. Foram utilizados dois marcadores de peso molecular, um de 100 bp (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, USA) e um de 25 bp (25 bp DNA Step Ladder, Promega, USA).

Tabela 1- Iniciadores utilizados nos painéis 1 e 2 (2A e 2B) do MLVA 16 (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007)

| VNTR nome | Iniciador Senso | Iniciador Consenso |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Painel 1 | | |
| 1 bruce06-BU1322_134bp_408bp_3u | 5'-ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG 3' | 5'-GCGTGACAATCGACTTTTTGTC-3' |
| bruce08-RU1134_18bp_348bp_4u | 5'-ATTATTTCGAGGCTCGTGATTC- 3' | 5'-ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC-3' |
| bruce11-BRU211_63bp_257bp_2u | 5'-CTGTTGATCTGACCTTGAACC-3' | 5'-CCAGACAACAACCTACGTCCTG-3' |
| bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u | 5'-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA-3' | 5'-GCCCAAGTCAACAGGAGTTTC-3' |
| bruce42-BU424_125bp_539bp_4u | 5'-CATCGCCTCAACTATAACCGTCA-3' | 5'-ACCGCAAAATTTACGCATCG-3' |
| bruce43-BRU379_12bp_182bp_2u | 5'-CATCGCCTCAACTATAACCGTCA-3' | 5'-ACCGCAAAATTTACGCATCG-3' |
| bruce45-BRU233_18bp_151bp_3u | 5'-ATCCTTGCTCTCCCTACCAG-3' | 5'-CGGGTAAATATCAATGGCTTGG-3' |
| bruce55-BU2066_40bp_273bp_3u | 5'-TCAGGCTGTTTCGTCAGTCTT-3' | 5'-AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT-3' |
| Painel 2 | | |
| 2^a bruce18-BRU339_8bp_146bp_5u | 5'-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT-3' | 5'-GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG-3' |
| bruce19-BRU324_6bp_163bp_18u | 5'-GACGACCCGGACCATGCTT-3' | 5'-ACTTCAACCGTAACGTCGTGGAT-3' |
| bruce 21BRU329_8bp_148bp_6u | 5'-CTCATGCGCAACCAAAACA-3' | 5'-ATCTCGTGGTCGATAATCTCATT-3' |
| bruce04-BRU1543_8bp_152bp_2u | 5'-TGACGAAGGGAAGGCAATAAG-3' | 5'-CGATCTGGAGATTATCGGGAAG-3' |
| bruce07-BRU1250_8bp_158bp_5u | 5'-GCTGACGGGAAGAACATCTAT-3' | 5'-ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAAA-3' |
| 2B bruce09-BRU588_8bp_156bp_7u | 5'-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC-3' | 5'-GGAGTATGTTTTGGTTGTCATAG-3' |
| bruce16-BRU548_8bp_152bp_3u | 5'-ACGGGAGTTTTGTTGCTCAAT-3' | 5'-GGCCATGTTCCGTTGATTTAT-3' |
| bruce30-BRU1505_8bp_151bp_6u | 5'-TGACCGCAAAACCATATCCTTC-3' | 5'-TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG-3' |

Fonte: Adaptado de Le Flèche et al., (2006).

Análise dos genótipos

O tamanho estimado da banda foi convertido em números de repetição de cada *locus* de acordo com Le Flèche et al. (2006), com a ajuda do software Bionumerics 5.1 (Applied-Maths, Bélgica). O tamanho da banda foi convertido em números de repetições por este aplicativo. Desta forma, as linhagens vacinais que continham números de repetição idênticos para os 16 alvos foram agrupadas em um único genótipo.

RESULTADOS

O presente estudo avaliou a estabilidade e variabilidade genética de linhagens vacinais de *Brucella abortus* produzidas por sete laboratórios brasileiros, bem como a estabilidade genética de isolados vacinais e cepas de referência após 10 repiques sucessivos, utilizando a técnica de MLVA.

Inicialmente, foram determinadas as eventuais diferenças na variabilidade genética entre os 16 *loci* selecionados para o MLVA-16. Assim, os *loci* Bruce04, Bruce06, Bruce08, Bruce09, Bruce11, Bruce12, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21, Bruce30, Bruce42, Bruce45 e Bruce55 não apresentaram diferenças no número de repetições. As linhagens vacinais B19 apresentaram diferença em relação às RB51 no *locus* Bruce43. Aquelas apresentaram duas repetições e esse, três. Entre as B19 observou-se variabilidade no *locus* Bruce07, sendo que um laboratório e seus repiques apresentaram seis repetições e o restante das amostras, cinco repetições. Esse mesmo *locus* também apresentou variabilidade nas linhagens vacinais de RB51. Um laboratório e seus repiques apresentaram seis repetições e o restante das amostras, cinco.

Com base nessas diferenças de variabilidade genética, foi possível identificar quatro genogrupos distintos, conforme dendrograma (Fig. 1), obtido a partir dos resultados de MLVA (Fig. 2 – 9). No genogrupo I foram agrupadas as 10 amostras de B19 do laboratório G (G1 - G10) e seus 10 repiques (G1/1 - G1/11). No genogrupo II, 43 amostras de B19 dos laboratórios A (1 - 9), B (1 - 2), D (1 - 10), E (1 - 10), F (1 - 4) e H (1 - 8) e os 10 repiques das amostras de referência de B19 (S1/1 - S1/11) e do laboratório E (E1/1 - E1/11). O 3º genogrupo agrupou as amostras vacinais de RB51 do laboratório Y (Y1 e Y2) e os 10 repiques da amostra Y1 (Y1/1 - Y1/11). O genogrupo IV ficou composto pelas 8 amostras vacinais de RB51 (X1 - X8) e os 10 repiques das amostras X1 (X1/1 - X1/11) e da cepa de referência de RB51 (R1/1 - R1/11).

Em síntese, os *loci* de divergência para identificação dos quatro genogrupos de *Brucella* foram os *loci* Bruce07 e Bruce43. Os genogrupos I e II apresentaram duas repetições no *locus* Bruce43 e os grupos III e IV, três repetições. Em relação ao *locus* Bruce07, os genogrupos I e III apresentaram seis repetições, o grupo II apresentou cinco e o grupo IV, sete.

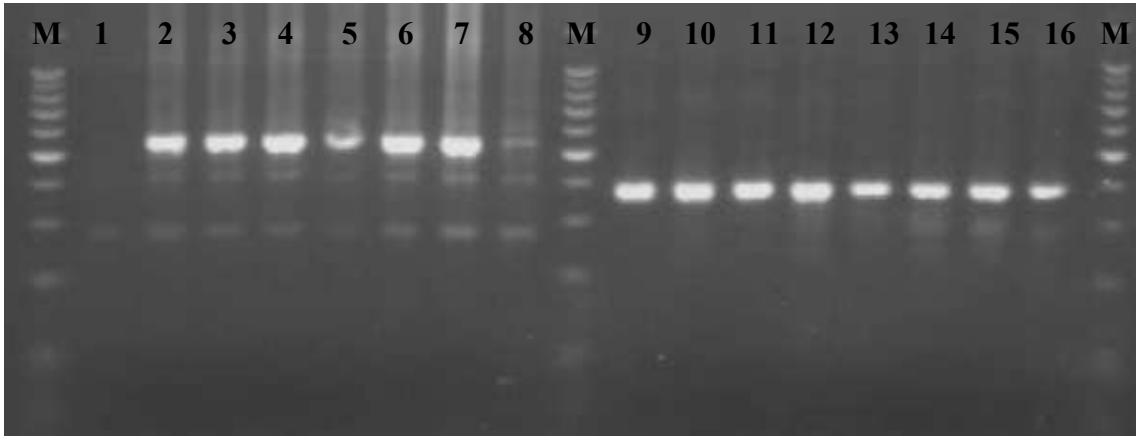


Fig. 2 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce06 e Bruce11. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce06: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. *Locus* Bruce11: 9, S1/7; 10, S1/8; 11, S1/9; 12, S1/11; 13, R1/2; 14, R1/3; 15, R1/4; 16, R1/5.

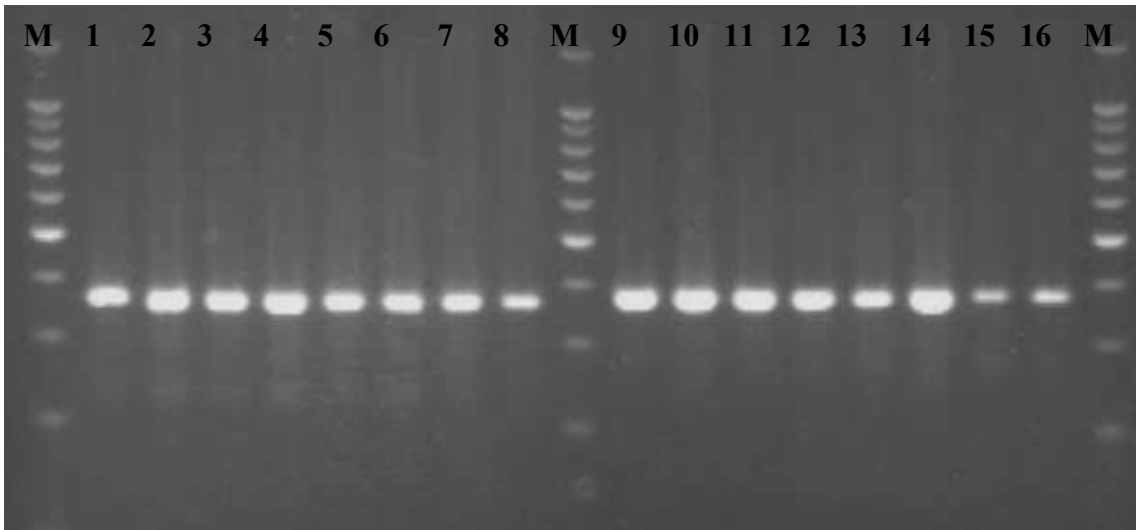


Fig. 3 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce08 e Bruce12. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce08: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. *Locus* Bruce12: 9, S1/7; 10, S1/8; 11, S1/9; 12, S1/11; 13, R1/2; 14, R1/3; 15, R1/4; 16, R1/5.

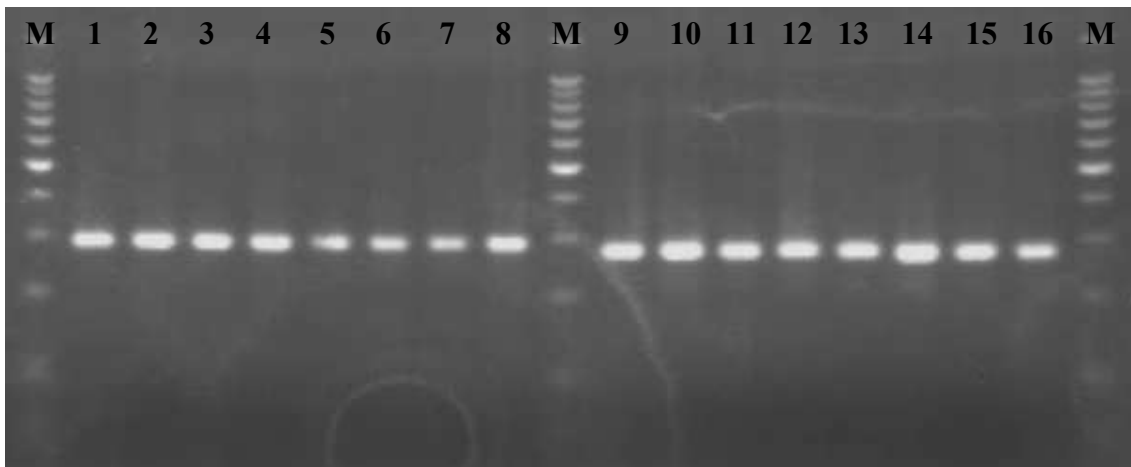


Fig. 4 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce42 e Bruce55. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce42: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. *Locus* Bruce55: 9, S1/7; 10, S1/8; 11, S1/9; 12, S1/11; 13, R1/2; 14, R1/3; 15, R1/4; 16, R1/5.



Fig. 5 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce43 e Bruce45. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce43: 1, R1/2; 2, S1/7; 3, S1/8; 4, R1/3; 5, S1/9; 6, R1/4; 7, S1/10; 8, S1/11. *Locus* Bruce45: 9, S1/7; 10, S1/8; 11, S1/9; 12, S1/11; 13, R1/2; 14, R1/3; 15, R1/4; 16, R1/5.

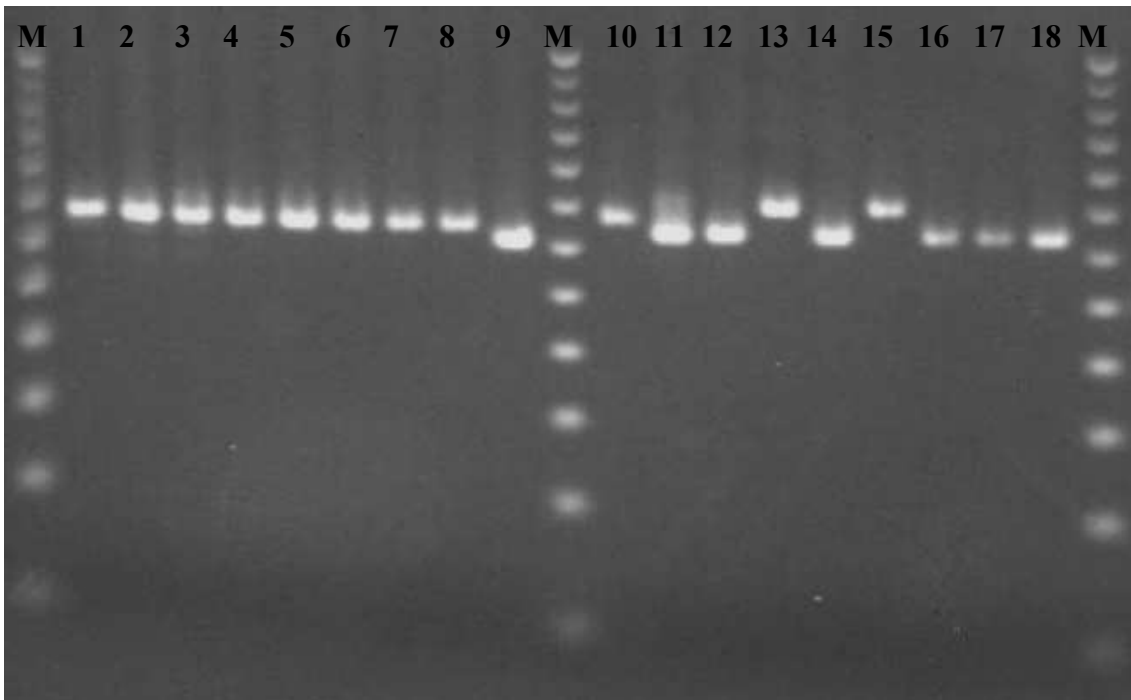


Fig. 6 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce04 e Bruce07. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce04: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. Nas posições 9 e 18, 16M. *Locus* Bruce07: 10, R1/1; 11, S1/7; 12, S1/8; 13, R1/2; 14, S1/9 15, R1/3; 16, S1/10; 17, S1/11.

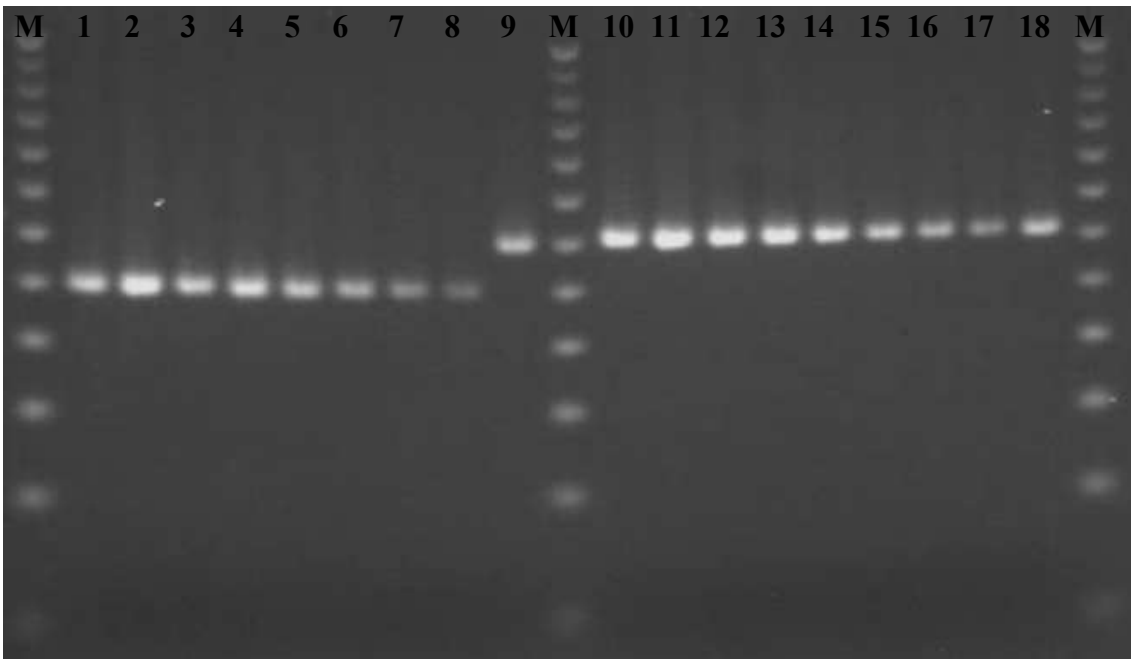


Fig. 7 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce09 e Bruce16. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce09: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. Nas posições 9 e 18, 16M. *Locus* Bruce16: 10, S1/7; 11, S1/8; 12, S1/9; 13, S1/11; 14, R1/2; 15, R1/3; 16, R1/4; 17, R1/5.

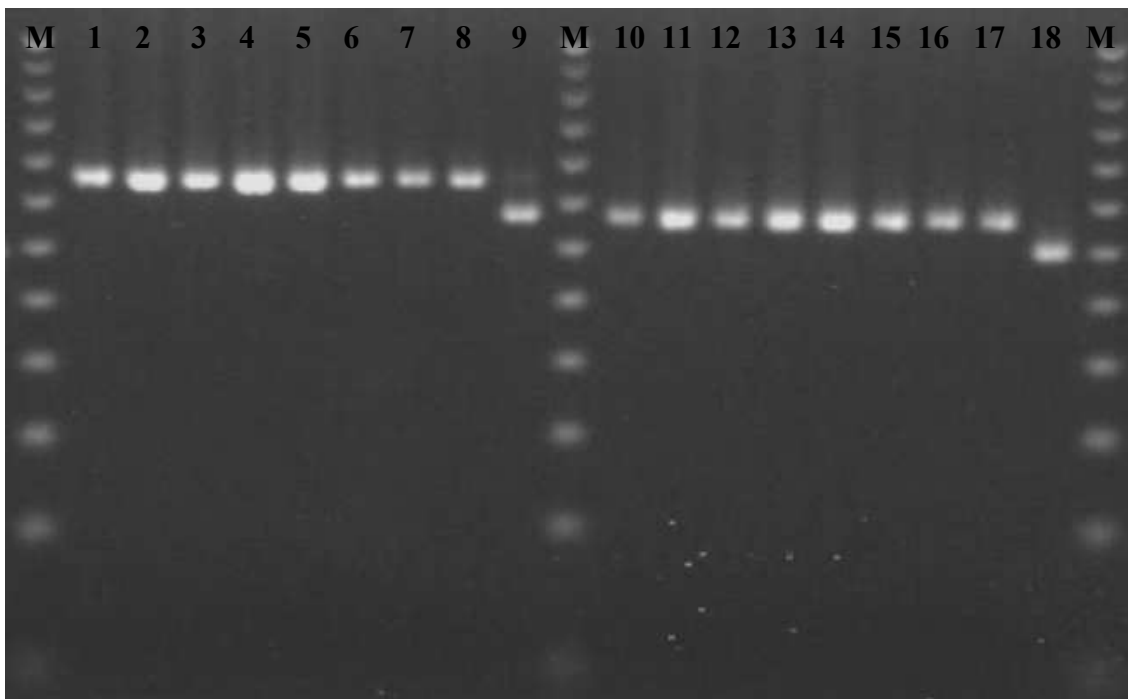


Fig. 8 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce19 e Bruce21. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce19: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. Nas posições 9 e 18, 16M. *Locus* Bruce21: 10, S1/7; 11, S1/8; 12, S1/9; 13, S1/11; 14, R1/2; 15, R1/3; 16, R1/4; 17, R1/5.

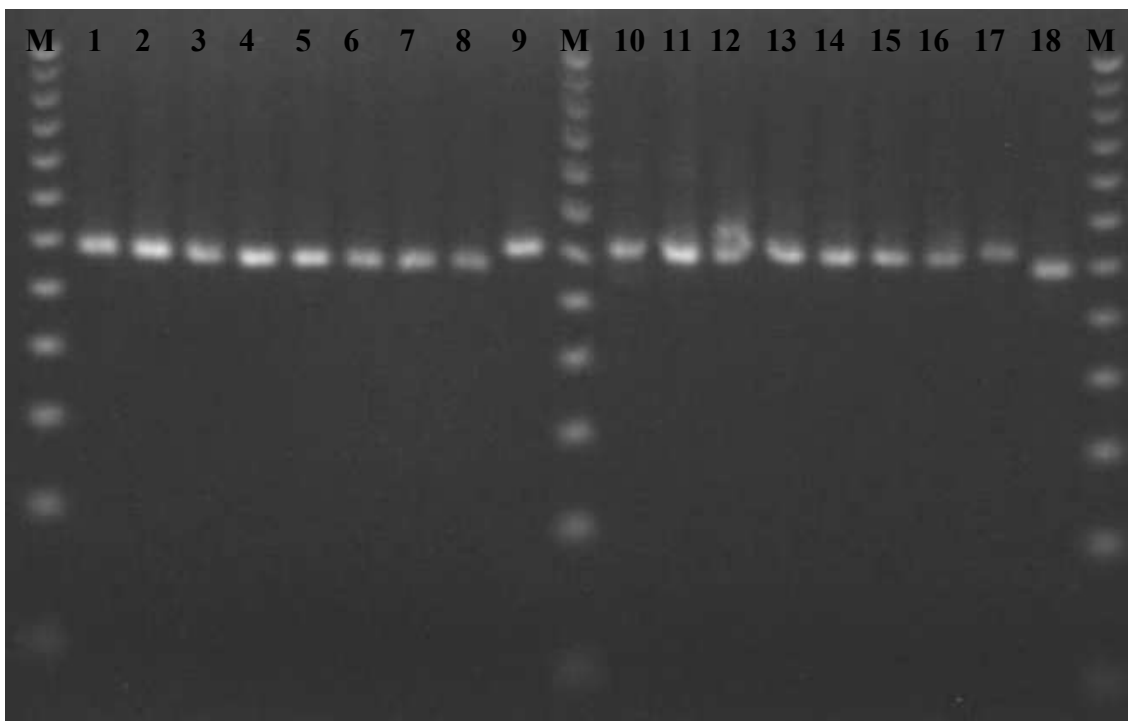


Fig. 9 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de MLVA dos *loci* Bruce30 e Bruce18. M, marcador de peso molecular; *locus* Bruce30: 1, S1/7; 2, S1/8; 3, S1/9; 4, S1/11; 5, R1/2; 6, R1/3; 7, R1/4; 8, R1/5. Nas posições 9 e 18, 16M. *Locus* Bruce18: 10, S1/7; 11, S1/8; 12, S1/9; 13, S1/11; 14, R1/2; 15, R1/3; 16, R1/4; 17, R1/5.

DISCUSSÃO

A análise da qualidade de amostras vacinais de *Brucella abortus* é aspecto relevante para a sanidade animal, no sentido de garantir a proteção adequada dos animais submetidos à vacinação (Brasil, 2006). Assim, a avaliação de eventuais mudanças no genoma dessas linhagens microbianas pode indicar a necessidade de um controle mais rigoroso no processo de produção dessas vacinas. O presente estudo identificou variabilidade genética nas linhagens de *Brucella abortus* presentes em vacinas B19 e RB51 produzidas por sete laboratórios brasileiros, utilizando a técnica de MLVA-16 (Le Flèche, 2006).

Estudos anteriores utilizaram a técnica de MLVA para análise de variabilidade genética voltada a outros microrganismos, como *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, verificando que essa técnica permite alta capacidade discriminatória e rapidez na obtenção de resultados a partir de um número grande de amostras (Titze-de-Almeida, 2004, Wang et al., 2009, Miko et al., 2010). Essa técnica já foi utilizada para análise de estabilidade genética em linhagens vacinais de *Brucella*, neste caso, da espécie *B. melitensis* (García-Yoldi et al., 2007). A técnica foi também utilizada para comparações entre amostras de *Brucella* spp de diferentes espécies isoladas no campo (Le Flèche et al., 2006, García-Yoldi et al., 2007, Maquart et al., 2009, Minharro, 2009).

No que se refere às amostras vacinais de *Brucella abortus*, espécie em estudo no atual projeto, a técnica de MLVA já foi empregada para análise de variabilidade de linhagens das vacinas B19 (Miranda, 2009). No entanto, ainda não foi descrito estudo de variabilidade genética por essa técnica de MLVA para linhagens da vacina RB51.

Deve-se observar que o *locus* Bruce07, que apresentou variação nas linhagens vacinais estudadas, faz parte do painel 2 do MLVA-16, painel especialmente desenhado para marcadores moleculares de maior variabilidade genética e, desta forma, maior capacidade discriminatória. Apesar de todas as regiões em estudo serem classificadas como regiões de repetição do DNA microbiano, as mesmas podem apresentar diferenças na variabilidade genética. Isto já foi observado anteriormente para B19, onde houve variação no *locus* Bruce07 (Miranda, 2009). García-Youldi et al. (2007) também realizou estudos de estabilidade genética em amostras vacinais, no entanto com a *B. melitensis* Rev1. Essa vacina,

Rev1, é mais suscetível a mutações que a B19, pois foram encontrados sete genótipos diferentes em 36 lotes vacinais. Para outras espécies microbianas também foram identificadas diferenças na variabilidade genética de regiões de repetição, o que indica a necessidade de um número satisfatório de *locus* para obtenção de adequada capacidade discriminatória (Titze-de-Almeida, 2004).

Em estudo realizado em 2009 por Miranda, foi utilizada a técnica MLVA-16 para análise de sete laboratórios produtores de vacina B19. Apenas o laboratório G apresentou diferença no *locus* Bruce07, com seis repetições, enquanto as vacinas dos demais laboratórios apresentaram cinco repetições. Tais resultados corroboram os achados do atual estudo, pois ambos agruparam amostras vacinais de B19 em apenas dois grupos distintos, divergindo apenas no *locus* Bruce07. Deve-se destacar que as alterações genéticas encontradas não causaram efeitos sobre a proteção, conforme resultados de testes de imunogenicidade, indicando que a vacina permaneceu com a característica protetora. Dessa forma, os dados de variabilidade genética devem ser interpretados com muita cautela quanto às consequências sobre a qualidade das vacinas produzidas comercialmente.

Um segundo aspecto abordado no presente estudo foi o possível efeito dos repiques sobre a estabilidade genética das linhagens vacinais. Neste sentido, não foi observada nenhuma alteração no número de repetições após 10 repiques sucessivos de vacinas B19, RB51 e cepas de referência. Isso indica estabilidade genética das amostras de *Brucella abortus* após repiques sucessivos, o que afasta este procedimento como causador das alterações genéticas observadas no atual estudo. Assim, estudos posteriores poderão elucidar qual teria sido o fator desencadeante da variabilidade genética observada no presente trabalho.

CONCLUSÕES

A presença de variabilidade entre linhagens vacinais avaliadas mostra a importância de se realizar o monitoramento da estabilidade genética das mesmas, visando assegurar a sua conformidade com as cepas de referência.

O presente estudo identificou dois genogrupos distintos de linhagens vacinais de *Brucella abortus* B19 e dois genogrupos de RB51.

A técnica MLVA-16 mostrou-se satisfatória para a análise de variabilidade genética de amostras vacinais, na medida em que apresentou capacidade discriminatória para distinguir os genogrupos entre as amostras em estudo.

REFERÊNCIAS

- AL DAHOUK, S., LE FLÈCHE, P., NÖCKLER, K., JACQUES, I., GRAYON, M., SCHOLZ, H. C., TOMASO, H., VERGNAUD, G., NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 137-145, 2007.
- BRASIL, 2004. Instrução Normativa nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. Regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 fev. 2004. Seção 1, p. 2.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 184 p. (Manual Técnico)
- GARCÍA-YOLDI, D., LE FLÈCHE, P., MARÍN, C. M., DE MIGUEL, M. J., MUÑOZ, P. M., VERGNAUD, G., LÓPEZ-GOÑI, O. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. **Vaccine**, p. 2858-2862, 2007.
- ICSP - International Committee on Systematics of Prokaryotes. **Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella***. Disponível em: www.the-icsp.org. Acesso em: 18 mar 2009.
- LE FLÈCHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON P., DENOEUDE, F., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A., VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat *loci* for a *Brucella* MLVA typing assay. **BioMed Central Microbiology**, v. 6, n. 9, 2006.
- MAQUART, M., LE FLÈCHE, P., FOSTER, G., TRYLAND, M., RAMISSE, F., DJONNE, B., AL DAHOUK, S., JACQUES, I., NEUBAUER, H., WALRAVENS, K., GODFROID, J., CLOECKAERT, 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*. **BioMed Central Microbiology**, v. 9, 145, 2009.
- MIKO A., LINDSTEDT B. A., BRANDAL L. T., LOBERSLI I., BEUTIN L. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. **FEMS Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 137-146, 2010.
- MINHARRO, S. 2009 **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2009. 77 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- MIRANDA, K. L. 2009 **Evaluation of brucellosis vaccines in Brazil**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2009. 77 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A., OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied**

- Microbiology**, vol. 8, p. 151-156, 1989.
- STOFFREGEN, W. C., OLSEN, S. C., WHEELER, C. J., BRICKER, B. J., PALMER, M. V., JENSEN, A. E., HALLING, S. M., ALT, D. P. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **Journal Veterinary Diagnostic Investiment**, v. 19, p. 227-237, 2007.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R. **Caracterização da resistência microbiana, virulência e variabilidade genética de enterococos**. Brasília, UnB, Faculdade de Medicina, 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)
- VERGNAUD, G., POURCEL, C. Multiple Locus VNTR (variable Number of Tandem Repeat) Analysis. **Molecular identification, systematics and population structure of prokaryotes**, E. Stackebrandt, Springer, 2006
- WANG Y. W., WATANABE H., PHUNG D. C., TUNG S. K., LEE Y. S., TERAJIMA J., LIANG S. Y., CHIOU C. S. *Multilocus* variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. **BioMed Central Microbiology**, v. 9, p. 278, 2009.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O atual estudo identificou variabilidade genética em linhagens de *Brucella abortus* de vacinas comerciais B19 e RB51. Destacou, assim, a importância de realização de técnicas de genotipagem para o acompanhamento e controle de cepas vacinais utilizadas no Brasil, em particular o MLVA-16. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) poderá, mediante o uso dessa técnica, identificar se as linhagens comerciais produzidas pelos laboratórios estão em conformidade com as cepas de referência, e, além disso, informar sobre o número de repiques que não provoca alterações no genoma microbiano. A técnica poderá, portanto, ser empregada em programas oficiais de monitoramento da qualidade dos lotes vacinais.