

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA VEGETAL



**Identificação de novas espécies de *Brucella* spp.: novas
ameaças para os humanos**

Maria Teresa Cordeiro Grilo

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Pelerito e Professor Doutor Rogério Tenreiro



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Resposta à Emergência e Biopreparação, sob a orientação direta da Doutora Ana Pelerito.

O Professor Doutor Rogério Tenreiro foi o orientador interno, designado no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação fazem parte da seguinte publicação:

Pelerito, A., Nunes, A., Grilo, T., Isidro, J., Silva, C., Ferreira, A. C., Valdezate, S., Nuncio, M. S., Georgi, E., & Gomes, J. P. (2021). Genetic Characterization of *Brucella* spp.: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. *Frontiers in Microbiology*, 12(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740068>

Para o meu Avô João

Agradecimentos

Uma Dissertação de Mestrado não é apenas o culminar de uma etapa, mas sim um percurso de aprendizagem, com altos e baixos. Este percurso é feito ao lado de pessoas que nos apoiam, e sem elas nada disto seria possível. É a essas pessoas que estiveram sempre ao meu lado, que agradeço.

Em primeiro lugar, um especial e enorme obrigado à minha orientadora, Doutora Ana Pelerito, por ter sido um exemplo para mim e um dos pilares essenciais deste trabalho. Sinto que me saiu a sorte grande em ter a Ana como orientadora e, acima de tudo, como amiga. Agradeço todos os conselhos, os ensinamentos e todo o conhecimento que me transmitiu ao longo deste tempo. Agradeço todo o cuidado que sempre teve comigo, a preocupação e o carinho para que tudo corresse da melhor forma, nunca hesitando em ajudar e socorrer as minhas dúvidas. A Ana enfrentou comigo todos os desafios, nunca me deixou baixar os braços nem desistir, mas sim motivar-me a fazer mais e melhor, e não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. A Ana é um exemplo de força e determinação, que admiro e respeito imenso. Foi um prazer poder trabalhar consigo! Se todas as pessoas fossem um terço do que a Ana é, o mundo seria um lugar muito mais bonito. OBRIGADO, do fundo do meu coração.

Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro, meu orientador interno, agradeço por ter sido a ligação com a “casa” onde tudo começou, e por ter sido nesta casa que o Professor Rogério despertou em mim a paixão, que antes não sabia que existia, pela Microbiologia. Foi o seu conhecimento e experiência que fizeram com que escolhesse este caminho e, por isso, o meu mais sincero obrigado.

Agradeço ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge por ter sido a minha “2ª casa”, e a todas as pessoas deste instituto que nunca hesitaram em ajudar-me, principalmente a todos os membros do Departamento de Doenças Infecciosas, por todo o carinho e amabilidade com que me receberam.

Aos meus amigos e colegas do INSA, Mariana, Miguel e Sofia, por tornarem os dias mais bonitos, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e por todas as conversas que tivemos sentados ao pé do pequeno lago.

Aos meus colegas da Cruz Vermelha Portuguesa, à minha Equipa Maravilha, Samanta, Miguel, Valéria e Luís, por me ajudarem em tudo o que preciso, por me darem apoio emocional nos dias mais difíceis e por tornarem os dias mais difíceis um pouco mais suportáveis. Por todas as gargalhadas, mesmo quanto tudo parecia um caos. Por me darem espaço para terminar este trabalho, nunca pedindo nada em troca. Obrigado por partilharem esta aventura comigo, tem sido de loucos, mas muito gratificante.

Agradeço aos que estão comigo desde o início desta aventura, ao meu Ohana: Tiago, Filipe, Miguel, Sasha, Gonçalo, Sofia, Blum, Chaby, Cardoso e Irma. Obrigado por me aceitarem como sou, por todas as aventuras, por todos os risos e todas as lágrimas, todas as parvoíces e pelo apoio que me deram em todas as etapas deste caminho. Obrigado pelos jantares, almoços e lanches que fazem com que uma pessoa se esqueça de todos os problemas. Não é desde sempre, mas sei que é para sempre. É um prazer ter-vos a todos na minha vida.

À minha amiga mais antiga, Sofia, obrigado. Obrigado por nunca me teres deixado desistir, por estares ao meu lado desde que me lembro. Obrigado por partilhares as minhas conquistas como se fossem tuas, por teres sempre uma palavra amiga para me dar e por me fazeres rir quando tudo está mal.

À minha família, por serem a base fundamental da pessoa que sou hoje, por aplaudirem as minhas conquistas e me levantarem nas minhas quedas. Um especial obrigado à Maria e à Luísa, por serem as melhores irmãs do mundo, por me ouvirem a qualquer hora, pelos abraços apertados e até pelas discussões. Obrigado por me ensinarem a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Ao João Maria, quero agradecer por me ter ensinado o que é amor de irmãos, por ter sempre acreditado em mim, por me ter apoiado em todas as etapas e por ter feito de mim a pessoa que sou hoje. Obrigado por seres quem és, por seres a melhor pessoa que já conheci. Lembra-te que desistir nunca é uma opção.

Ao meu Pai e à minha Mãe, Pedro e Isa, obrigado por me terem ajudado a construir tudo o que sou, por enfrentarem comigo todos os meus desafios e por celebrarem de forma orgulhosa todas as minhas vitórias, por pequenas que fossem. Obrigado pelo suporte incondicional, pelos conselhos e por terem sempre acreditado em mim. Nunca me deixaram desistir, e insistiram sempre para que eu fizesse mais e melhor. Obrigado pelos esforços incansáveis, por nunca baixarem os braços contra as adversidades, dando-me a mim força para nunca baixar os meus. São o meu maior exemplo e o meu porto de abrigo, e este trabalho é tanto meu como vosso. É para sempre vosso o meu mais sincero amor, e o meu mais eterno obrigado.

Agradeço ao meu fiel companheiro, Alex, ao meu amigo de todos os dias e pilar fundamental da minha vida. Obrigado por estares lá em todos os momentos, nos altos e nos baixos. Obrigado por me motivares quando acho que nunca vou conseguir, por me fazeres ver que sou capaz de alcançar tudo, basta acreditar e lutar. Obrigado por seres quem és e por me aturares, por toda a preocupação e carinho que me dás, por todo o amor que partilhas comigo. Obrigado por todos os sorrisos de orgulho e todos os abraços de consolo. Acima de tudo, obrigado por fazeres parte da minha vida.

Aos meus avós, António e Zárta, obrigado por terem sempre acreditado em mim. Pelo amor incondicional e pelo apoio desmedido, por celebrarem todos os meus sucessos de uma forma especial e única. Por olharem para este trabalho e, mesmo sem perceberem nada dizerem “Bom Trabalho”. Obrigado por serem tudo o que os avós são.

À minha Avó Arlete, por ser uma força da natureza e por me fazer ver que tudo se faz com esforço e dedicação. Ensinaste-me a lutar pelos meus sonhos e a levantar-me após cada queda. És a pessoa mais corajosa que conheço. Obrigado por estares sempre ao meu lado, por me abraçares e ouvires com toda a atenção, por estares sempre interessada, mesmo que tenhas de escrever o nome do meu curso num papel para nunca te esqueceres. Obrigado por seres o exemplo de Mulher que és.

Por último, ao meu Avô João, por me ensinar a nunca desistir, e que estaria a celebrar todas as minhas conquistas como se fossem dele. É para ti este trabalho, querido Avô.

Resumo

A brucelose é uma doença zoonótica mundial causada por *Brucella* spp., uma alfa-proteobactéria Gram-negativa, capaz de infectar uma vasta gama de mamíferos, que incluem animais domésticos, animais selvagens e seres humanos. Dentro do gênero de *Brucella* estão descritas 12 espécies, três das quais (*Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella melitensis*) estão mais frequentemente associadas à brucelose humana, comumente designadas por espécies clássicas. Desde o final dos anos 90, foram isoladas a partir de seres humanos, animais selvagens e fontes ambientais várias espécies de *Brucella* spp., evidenciando a existência de uma gama de hospedeiros mais ampla. Algumas destas espécies recentemente descritas são geneticamente e/ou fenotipicamente diferentes quando comparadas com as espécies clássicas, o que pode resultar em potenciais novas ameaças zoonóticas. Nos dias de hoje, apenas algumas espécies clássicas de *Brucella* spp. estão sujeitas a estratégias de controlo e vigilância na Europa, enquanto as novas espécies detetadas se encontram potencialmente subdiagnosticadas na vida selvagem.

Com o presente trabalho, e através de uma abordagem *One Health*, pretendeu-se realizar a identificação e caracterização de novas espécies de *Brucella* spp. através de soros humanos, pertencentes à seroteca do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, tanto com recurso a metodologias de diagnóstico diretas, como o teste de aglutinação Rosa de Bengala, tal como através de técnicas moleculares, como PCR em tempo real. De um total de 168 amostras analisadas, apenas 21 apresentaram um resultado positivo através de PCR e, após sequenciação, nenhuma das amostras apresentou o genoma correspondente a *Brucella* spp. Estes resultados realçam as dificuldades inerentes ao diagnóstico deste microrganismo, podendo as mesmas ajudar na otimização da caracterização e tipagem de *Brucella* em trabalhos futuros.

Igualmente neste trabalho, e utilizando uma abordagem inovadora, recorrendo às novas metodologias de sequenciação de nova geração, foi possível validar a utilização do perfil de MLVA-16, a técnica *gold standard* para a tipagem de *Brucella* spp., utilizando a extração de genótipos *in silico*. Neste sentido, pretendia-se avaliar o desempenho de um *script Python*, comparando-o com a abordagem de MLVA baseada em PCR, em 83 estirpes de diferentes espécies de *Brucella*. A abordagem de MLVA baseada em WGS detetou 95,3% de todos os 1 328 possíveis *hits* (83 estirpes x 16 *loci*) e mostrou uma taxa de concordância de 96,4% com o procedimento de MLVA clássico baseado em PCR. Este *script* parece ser uma ferramenta muito útil e robusta para a determinação *in silico* dos perfis de MLVA para as estirpes de *Brucella*, permitindo estudos epidemiológicos moleculares, importantes para a manutenção de uma vigilância ativa da brucelose.

Palavras-chave: *Brucella* spp., brucelose, tipagem molecular, espécies clássicas, novas espécies, MLVA, WGS, *script Python*.

Abstract

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease caused by *Brucella* spp., a Gram-negative alphaproteobacteria capable of infecting a wide range of mammals, which includes domestic animals, wild animals and humans. Within the *Brucella* genus, 12 species were described so far, three of which (*Brucella abortus*, *Brucella suis* and *Brucella melitensis*) are usually associated with human brucellosis, commonly referred to as classical species. Since the late 1990s, several species of *Brucella* spp. have been isolated from humans, wildlife, and environmental sources, highlighting the existence of a wide variety of host range. Some of these newly described species are genetically and/or phenotypically different when compared to the classical ones, which may result in potential new zoonotic threats. Nowadays, only a few classical *Brucella* species are subjected to control and surveillance strategies in Europe, while the newly detected species are potentially underdiagnosed.

With this study, and through a One Health approach, we aimed to identify and characterize new species of *Brucella* spp. using human sera from the Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, using direct diagnostic methodologies (such as the Rose of Bengal agglutination test) and molecular techniques, as real-time PCR. From a total of 168 samples analyzed, only 21 were positive through PCR, and after sequencing, none of the samples' genome corresponded to *Brucella* spp. ones. Although these results expose the inherent difficulties to the diagnosis of this microorganism, they might be useful to optimize future work on *Brucella* typing and characterization.

Also in this study, using an advanced approach, the new generation sequencing methodologies, allowed the validation of MLVA-16 profiling, the gold standard technique for *Brucella* spp. typing, using *in silico* genotyping extraction. In this regard, we aimed to evaluate the performance of a Python script, comparing it with the PCR-based MLVA approach on 83 strains of different *Brucella* species. In fact, WGS-based MLVA approach detected 95.3% of all 1 328 possible hits (83 strains x 16 *loci*) and showed a 96.4% concordance rate with the PCR-based MLVA procedure. This script appears to be a very useful and robust tool for *in silico* determination of MLVA profiles for *Brucella* strains, allowing molecular epidemiological studies, being important to maintain an active epidemiological surveillance of brucellosis.

Keywords: *Brucella* spp., molecular typing, classical species, new species, MLVA, WGS, Python script.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
<i>Abstract</i>	vi
Índice.....	vii
Lista de Tabelas e Figuras	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
I. Introdução.....	2
1. Enquadramento Histórico.....	3
2. Género <i>Brucella</i>	4
2.1 Caraterísticas Morfológicas e Genoma	4
2.2 Taxonomia e Filogenia	5
2.3 Patogenicidade e Resposta Imunitária.....	8
3. Epidemiologia	9
4. Brucelose Humana	11
4.1 Transmissão.....	11
4.2 Manifestações Clínicas e Terapêutica	11
4.3 Diagnóstico.....	12
4.3.1 Cultura.....	13
4.3.2 Testes Serológicos	13
4.3.3 Técnicas Moleculares	14
5. Métodos de Tipagem e Caraterização de Estirpes de <i>Brucella</i> spp.....	14
5.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	15
5.2 Sequenciação de DNA.....	15
5.3 <i>Multilocus Sequencing Typing</i> (MLST)	16
5.4 <i>Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis</i> (MLVA).....	17
6. Objetivos	18
II. Identificação de novas espécies de <i>Brucella</i> spp.....	20
Contextualização Teórica	21
Materiais E Métodos	22
1. Material Biológico.....	22
2. Teste de Aglutinação Rosa de Bengala	22
3. Extração de DNA	23
4. PCR em tempo real (RT-PCR).....	23

5. Sequenciação de DNA.....	24
Resultados	25
Discussão.....	28
Conclusão e Perspetivas Futuras	31
III. <i>Multiple Locus Variable number tandem repeats Analysis</i>	34
Contextualização Teórica	35
Materiais E Métodos	36
1. Estirpes bacterianas	36
2. MLVA-16 (MLVA_Lab)	36
3. <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS).....	38
4. MLVA baseado em WGS (MLVA_WGS)	38
5. Avaliação da concordância MLVA_WGS <i>versus</i> MLVA_Lab	38
Resultados	40
Discussão.....	43
Conclusão e Perspetivas Futuras	45
Referências Bibliográficas	47
Material Suplementar	57

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela I.1 – Espécies de <i>Brucella</i> , incluindo os respectivos biovars, hospedeiros e grau de patogenicidade para o Humano.	7
Tabela II.1 - Resultados das sequências obtidas para as 21 amostras através do Software Chromas LITE 2.1.1.	27
Tabela III.1 - <i>Primers</i> utilizados em cada uma das reações Multiplex.	37
Figura I.1 - Estrutura esquemática do lipopolissacárido (LPS) de <i>Brucella</i> spp.	5
Figura I.2 – Taxa anual de brucelose por 100 000 habitantes entre os anos 2000 e 2021.	9
Figura I.3 - Taxa de notificação de casos de brucelose confirmados por 100 000 habitantes na UE/EEE, no ano de 2017.	10
Figura II.1 – Cartão de reação com o reagente Rosa de Bengala.	23
Figura II.2 - Curvas de amplificação obtidas numa das reações de RT-PCR.	26
Figura III.1 - Número de <i>loci</i> MLVA detetados por estirpe através das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS.	41
Figura III.2 - Desempenho das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS <i>per locus</i>	41
Figura III.3 - Influência da profundidade média de cobertura e do número de <i>contigs</i> na eficácia da extração de MLVA_WGS.	42
Tabela S1 – Lista dos soros selecionados para o procedimento experimental.	57
Tabela S2 - Lista dos soros selecionados com resultado positivo para <i>Brucella</i> spp.	61
Tabela S3 - Lista dos soros com resultado positivo para a reação de PCR em tempo real, após extração de DNA.	62
Tabela S4 – Estirpes de <i>Brucella</i> spp. utilizadas na avaliação da concordância MLVA_WGS <i>versus</i> MLVA_Lab.	63
Tabela S5 – Tamanhos esperados de VNTR <i>per locus</i> das sequências de <i>Brucella</i> spp. atualmente conhecidas, e valor alélico correspondente.	66
Tabela S6 – Resultados dos perfis alélicos das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS.	67
Figura S1 - Influência da qualidade dos genomas montados na eficácia da extração de <i>loci</i> do perfil de MLVA_WGS.	71

Lista de Abreviaturas

- BCV** – *Brucella Containing Vacuole*
- BSL-3** – Laboratório de Biossegurança de Nível 3
- CDC** - *Centers for Disease Control and Prevention*
- DDI** – Departamento de Doenças Infeciosas
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- INSA** – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
- LPS** – Lipopolissacárido
- MLSA** – *Multilocus Sequencing Analysis*
- MLST** – *Multilocus Sequencing Typing*
- MLVA** – *Multiple-Locus Variable number tandem repeats Analysis*
- NLRs** – *NOD-Like Receptors*
- NT** - Nucleótido
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PAMPs** – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*
- R-LPS** – *rough-LPS*
- RBT** – Teste Rosa de Bengala
- RT-PCR** – *Real Time Polymerase Chain Reaction*
- S-LPS** – *smoth-LPS*
- SNP** – *Single Nucleotide Polimorphisms*
- TAS** – Teste de Aglutinação Sérica
- TLRs** – *Toll-Like Receptors*
- UE** – União Europeia
- UE/EEE** – União Europeia/Espaço Económico Europeu
- VNTR** – *Variable number tandem repeats*
- WGS** – *Whole Genome Sequencing*

I. Introdução

1. Enquadramento Histórico

A saúde humana e animal estão inexoravelmente relacionadas. O Homem depende dos animais para alimentação, desenvolvimento socioeconómico e companhia. No entanto, os animais podem transmitir aos humanos um grande número de doenças, designadas de zoonoses, e algumas delas com potencial devastador. A brucelose é uma doença em permanente evolução, desde a sua identificação em 1886 por David Bruce, um cirurgião do exército britânico, que isolou do baço de um indivíduo que tinha falecido com Febre de “Malta” um cocobacilos a que deu o nome de “*Micrococcus melitensis*”^{1,2}. Esta doença era endémica em Malta, sendo muitas vezes confundida com outras doenças, como é o caso da malária. Entre 1901 e 1906, a brucelose afetou cerca de 652 civis e 605 militares, com uma taxa de mortalidade de 10,4% e 2,3%, respetivamente³. Durante quase 20 anos, após o isolamento de *Micrococcus melitensis*, julgava-se que esta doença era transmitida através de um vetor, e somente em 1905 é que ficou demonstrado (por Themistocles Zammit) que a natureza zoonótica provinha de leite de cabra⁴. Começou então a entender-se que a manifestação da brucelose estava associada a pessoas que consumiam leite de cabra ou a pessoas que permaneciam em contacto com caprinos, e logo foi possível o isolamento deste microrganismo nestes animais⁵. Por volta de 1920, o género passou a chamar-se *Brucella*, em homenagem a David Bruce, com registo das espécies de *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis*. Este momento marcou o início da história da brucelose, considerada uma das zoonoses bacterianas mais extensas a nível global, com uma infeção complexa em animais e humanos^{6,7}.

A brucelose é uma doença que afeta várias espécies de mamíferos, podendo ser igualmente transmitida ao homem. O número de 500 000 novos casos humanos por ano é evidenciado em trabalhos de investigação e em revisões, no entanto este valor é apenas uma estimativa, pois a maioria dos países mais afetados não dispõem de infraestruturas de diagnóstico, e os sintomas associados à infeção por *Brucella* spp. podem ser confundidos com outras doenças febris⁸. A brucelose permanece como uma doença sub-diagnosticada e negligenciada, supondo-se que o número estimado de casos não reportados seja quase dez vezes superior^{4,9}. Dentro do género de *Brucella* estão descritas 12 espécies, três das quais (*Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella melitensis*) estão mais frequentemente associadas à brucelose humana^{10,11}, as quais são comumente designadas por espécies clássicas. *B. abortus* é a espécie mais disseminada a nível mundial e *B. melitensis* produz uma infeção grave nos seres humanos, pois é a espécie mais virulenta e com maior impacto em saúde pública a nível da União Europeia^{12,13}.

As espécies de *Brucella* spp., e em particular a espécie *B. melitensis* e a espécie *B. suis*, são consideradas como potenciais agentes de bioterrorismo¹⁴ devido à sua capacidade de formar aerossóis, e a inclusão de *Brucella* spp. na lista de agentes com potencial para bioterrorismo aumentou a preocupação das autoridades responsáveis pela saúde humana e animal¹⁵. Esta situação levou a que os laboratórios de referência atualizassem e melhorassem os seus métodos laboratoriais de diagnóstico e deteção deste agente patogénico em amostras ambientais, alimentares e biológicas^{7,12,16}. A cooperação de vários setores no apoio aos cuidados de saúde primários desempenha um papel crucial no controlo da brucelose, podendo contribuir para o desenvolvimento de infraestruturas adequadas em áreas de produção animal, higiene alimentar e cuidados de saúde¹⁷.

2. Género *Brucella*

2.1 Características Morfológicas e Genoma

Em termos morfológicos, as bactérias do género *Brucella* são pequenos cocobacilos (0,5-0,7 µm de diâmetro, 0,6-1,5 µm de comprimento) que formam colónias lisas ou rugosas e de cor esbranquiçada. São alfa-proteobactérias Gram-negativas e intracelulares facultativas, pois apesar de possuírem a capacidade de sobreviver no meio ambiente, têm como habitat preferencial o meio intracelular das células^{10,18}. São aeróbias não fermentadoras de açúcares¹⁹, sem cápsula e não formadoras de esporos^{9,15,20}, e apesar de carecerem de mobilidade, possuem todos os genes necessários à montagem de um flagelo funcional²¹. Tendo por base sequências de rRNA 16S, as espécies de *Brucella* spp. estão classificadas como α -2 Proteobactérias, possuindo relações filogenéticas estreitas com *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* e *Rhodobacter*^{10,11,22}. Pertencem a um dos maiores e mais diversificados grupos dentro do filo Proteobacteria, a classe Alphaproteobacteria¹¹.

As bactérias do género *Brucella* possuem uma membrana citoplasmática, constituída por uma bicamada fosfolipídica na qual estão inseridas as proteínas. Como é comum em bactérias Gram-negativas, as bactérias deste género possuem uma parede celular constituída por peptidoglicano e uma membrana externa. A membrana externa é essencialmente constituída por fosfolípidos, proteínas e uma molécula anfipática, o lipopolissacárido (LPS)²³. O LPS está localizado no folheto externo da membrana e foi identificado como um importante determinante de virulência destas bactérias. Este género inclui espécies que podem ocorrer nas formas lisa ou rugosa, dependendo de três domínios: o lípido A, o núcleo ou core oligossacárido, e o antígeno O (ou cadeia lateral O) do tipo de LPS presente na membrana externa. O LPS pode ser liso (*smooth*-LPS; S-LPS) quando contém a cadeia lateral O²⁴ ou pode ser rugoso (*rough*-LPS; R-LPS) quando a cadeia lateral O não está presente²⁵ (**Figura I.1**). As estirpes de *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* podem ser lisas (S) ou rugosas (R), através da expressão de S-LPS ou de R-LPS, respetivamente. Contudo, as estirpes de *B. ovis* e de *B. canis* são naturalmente rugosas expressando, assim, R-LPS²⁶. O S-LPS tem um papel fundamental na sobrevivência intracelular e, quando comparado com o LPS das enterobactérias (como é o caso da *Escherichia coli*), o S-LPS tem baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade e baixa atividade ferro pénica²⁷.

A nível do genoma das bactérias deste género e apesar das diferenças de virulência e afinidade para os seus hospedeiros, as espécies de *Brucella* spp. possuem genomas bastante similares, quer em tamanho quer em composição de bases¹⁹, apresentando uma homologia superior a 90% demonstrada em ensaios de hibridação DNA-DNA²⁸. A sequenciação do genoma demonstra que os genes partilhados entre *B. melitensis* e *B. abortus* exibem mais de 94% de identidade sequencial, com genes essenciais que partilham 99% de identidade nucleotídica²⁹. No entanto, existe uma diferença na gravidade da doença causada por estes dois microrganismos, que pode ser justificada por pequenas diferenças nos seus genomas³⁰. Os genomas de *B. melitensis* e *B. suis* são altamente conservados, com apenas 35 genes presentes em *B. melitensis* que se encontram ausentes em *B. suis*, e *B. abortus* não possui genes únicos^{31,32}. O genoma de todas as espécies de *Brucella* (com exceção de *B. ovis*) é constituído por dois cromossomas circulares com tamanhos compreendidos entre 2,1 Mb e 1,2 Mb, respetivamente. *B. ovis* possui apenas um cromossoma com um tamanho de aproximadamente 3,3 Mb³³.

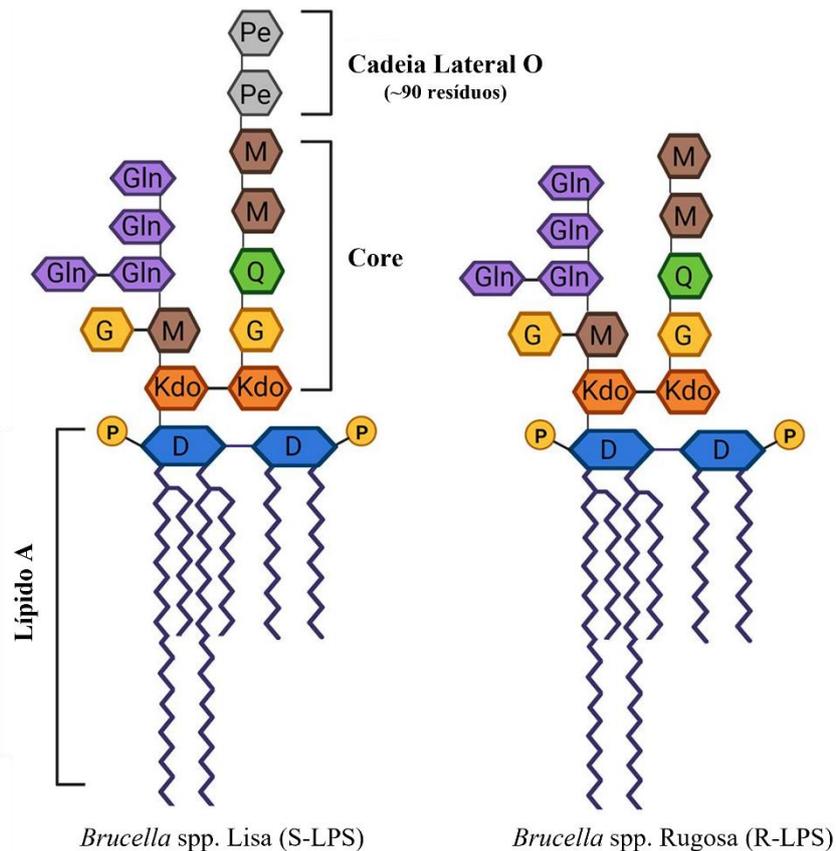


Figura I.1 - Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella* spp. *Brucella* spp. pode ser classificada como lisa se possuir o O-polissacarídeo intacto (ou Cadeia Lateral O), como é o caso da maioria das estirpes zoonóticas. Alternativamente, *B. canis* e *B. ovis* são naturalmente rugosas, faltando a estas espécies a totalidade da Cadeia Lateral O. (Adaptado de Stranahan and Arenas-Gamboá, 2021).

2.2 Taxonomia e Filogenia

As Alphaproteobacteria são um grupo de bactérias Gram-negativas bastante diversificado, que ocupa vários nichos no ambiente e que, como tal, incluem microrganismos que podem ser patogênicos para mamíferos, plantas ou simbioses³⁴. O conceito de espécie para o gênero *Brucella* foi bastante debatido, mas com o aparecimento de técnicas moleculares e genéticas, foi possível adotar um gênero convencional que inclui várias espécies. Diversos estudos indicam que a maioria das espécies de *Brucella* diverge de um ancestral comum, pertencente à linhagem de *B. ovis*, e o alto grau de semelhança de todos os genomas de *Brucella* (quando comparada com outros grupos bacterianos) sugere uma relação filogenética próxima entre estes microrganismos¹⁸. A especulação que residia sobre a origem das espécies de *Brucella* centrou-se na aparente adaptação destas bactérias a hospedeiros específicos. No entanto, a preferência por certos hospedeiros descrita em *Brucella* spp. não é tão estrito como aparenta, uma vez que *Brucella* pode infectar animais que não sejam o seu hospedeiro primário, embora estas infecções sejam limitadas. O tamanho relativamente grande do genoma das bactérias deste gênero sugere que possam existir em ambientes diversificados, no entanto, *Brucella* é usualmente encontrada em associação com os seus hospedeiros preferenciais, associação essa que resulta de mudanças adaptativas ao longo do tempo³⁴. O exato progresso da adaptação de *Brucella* à vida intracelular é desconhecido, mas sabe-se que envolve perda, aquisição e modificação de determinadas características genéticas. De acordo com os altos níveis de homologia observados entre as espécies de *Brucella* spp., parece provável que a ramificação do ancestral comum em diferentes espécies, bem como a adaptação

destas aos seus hospedeiros preferenciais, tenha sido um processo rápido e recente, em comparação com outros grupos bacterianos ^{35,36}.

O género *Brucella* teve origem com duas espécies, *B. abortus* e *B. melitensis*, cujos hospedeiros preferenciais são, respetivamente, bovinos e pequenos ruminantes. *B. suis* foi isolada pela primeira vez a partir de um feto de porco abortado na Europa, em 1909. Durante muitos anos, acreditava-se que este isolado era uma variante altamente patogénica de *B. abortus*, mas em 1929, *B. suis* foi considerada uma espécie separada. Nos anos seguintes, foram acrescentadas novas espécies ao género *Brucella*: em 1956, *B. ovis* foi isolada a partir de ovelhas com epididimite ³⁷; em 1957 foi isolada *B. neotomae* através de ratos da madeira no deserto de Utah (Estados Unidos da América) por Stoenner e Lackman; e em 1968, Carmichael e Bruner descobriram *B. canis* como causa de uma epidemia de abortos em cães de raça Beagle ³⁸. As três primeiras espécies (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*) são ainda divididas em biovars, tendo por base características fenotípicas e serológicas. Desde 2007 foram incluídas mais espécies no género, como *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos ³⁹, *B. microti* através de pequenos roedores ⁴⁰, *B. inopinata* de um implante inflamado num paciente de 71 anos ⁴¹ e, mais recentemente, *B. papionis* isolado de babuínos ⁴² e *B. vulpis* de raposas ⁴³. Como a maioria das espécies de *Brucella*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* e *B. papionis* são agentes patogénicos de crescimento fastidioso e lento, com atividade metabólica limitada, enquanto as espécies *B. microti*, *B. inopinata* e *B. vulpis* são bactérias de crescimento rápido e com um perfil bioquímico que se assemelha aos membros do género *Ochrobactrum* ^{41,43-45}. Outras estirpes “atípicas” de *Brucella* foram isoladas de diversas fontes animais, como roedores selvagens ⁴⁶, sapos ⁴⁷ e peixes ⁴⁸. Apesar das diferenças entre as espécies de *Brucella* spp. na afinidade com o hospedeiro, todas apresentam um comportamento patogénico muito semelhante, enquanto variam na virulência. Os hospedeiros preferenciais e a patogenicidade para o Humano das 12 espécies de *Brucella* reconhecidas estão descritas na **Tabela I.1**.

O entendimento atual da filogenia de *Brucella* spp. tem sido elucidado através de vários métodos, como *Multiple Locus Variable number tandem repeat Analysis* (MLVA) ⁴⁹⁻⁵¹, *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) ^{10,52,53}, *Multilocus Sequencing Analysis* (MLSA), estudos de microarranjo ^{22,54,55} e *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNP) ^{29,31,34,56,57}. A análise filogenética mostra que todas as espécies de *Brucella* são monofiléticas e a maioria das análises referidas na literatura distinguem, pelo menos, seis linhagens dentro de *Brucella* spp.: *B. abortus*/*B. melitensis*; *B. canis*/*B. suis*; *B. ovis*; *B. ceti*/*B. pinnipedialis*; *B. neotomae*; e *B. microti*. Destas linhagens, *B. abortus* e *B. melitensis* são as espécies que se encontram mais estreitamente relacionadas, sendo também detetada uma estreita relação entre *B. canis* e *B. suis* biovars 3 e 4, enquanto *B. suis* biovars 1, 2 e 5 foram atribuídos a ramos diferentes. Por sua vez, *B. neotomae* e *B. ovis* demonstram maiores níveis de divergência com outras espécies de *Brucella* ^{49,56,58}. Para as novas espécies *B. inopinata*, *B. papionis* e *B. vulpis* existem poucos estudos descritos na literatura, mas um trabalho desenvolvido nos últimos anos confirma as linhagens acima mencionadas, e coloca *B. papionis* intimamente relacionada com *B. ovis*. As espécies atípicas *B. inopinata* e *B. vulpis* são colocadas em dois ramos separados ⁵³.

Tabela I.1 – Espécies de *Brucella*, incluindo os respectivos biovars, hospedeiros e grau de patogenicidade para o Humano (Adaptado de Al Dahouk, Sprague e Neubauer, 2013 e de Ferreira A., 2018).

Espécies de <i>Brucella</i>	Biovars	Hospedeiro Preferencial	Patogenicidade para o Humano
<i>B. abortus</i>	1-7, 9	Bovinos	Alta
<i>B. melitensis</i>	1-3	Ovinos; caprinos	Alta
	1,3	Suínos	Alta (biovars 1, 3 e 4)
	2	Javali; lebre	
	4	Caribou; rena	
	5	Roedores	
<i>B. canis</i>	-	Canídeos	Moderada
<i>B. ovis</i>	-	Carneiro	Inexistente
<i>B. neotomae</i>	-	Roedores	Inexistente
<i>B. ceti</i>	-	Cetáceos	Desconhecida
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Pinípedes	Desconhecida
<i>B. microti</i>	-	Rato; raposa; solo	Desconhecida
<i>B. inopinata</i>	-	Desconhecido	Alta
<i>B. papionis sp. nov.</i>	-	Babuínos	Desconhecida
<i>B. vulpis sp. nov.</i>	-	Raposa	Desconhecida

A determinação das relações entre as espécies de *Brucella* é essencial para um melhor entendimento da sua ecologia, história evolutiva e relações com os seus hospedeiros, para que seja possível desenvolver métodos de genotipagem precisos⁵⁷. A classificação das espécies de *Brucella* é baseada, sobretudo, em diferenças nas suas características morfológicas, na sua preferência de hospedeiros e no nível da sua patogenicidade⁵⁹. Contudo, tendo por base o elevado grau de homologia existente entre as espécies deste género foi proposto, em 1985, que estas fossem agrupadas como biovars de uma única espécie²⁶. A comunidade científica não se mostrou confiante com esta proposta, uma vez que os laboratórios clínicos e veterinários se encontravam acostumados às designações originais para propósito epidemiológico e, assim, o Subcomité Taxonómico de *Brucella* retomou a nomenclatura original³⁵. Mais tarde, e através de análises moleculares, foi possível demonstrar a existência de diferenças genómicas entre as espécies e biovars de *Brucella*, sendo estas diferenças consistentes com a utilização de critérios fenotípicos, metabólicos, de patogenicidade e de preferência de hospedeiros para distinguir as espécies deste género.

As espécies emergentes de *Brucella* partilham uma identidade nucleotídica de, aproximadamente, 98% quando comparadas com as espécies clássicas. Estas espécies emergentes possuem informações adicionais, tais como bacteriófagos, sequências de inserção e vários genes presentes em alfaproteobactérias associadas ao solo/plantas, mas que se encontram ausentes nas espécies clássicas. A filogenia baseada em WGS colocou todas estas novas espécies separadas das espécies clássicas de *Brucella*, e mais próximas da linhagem de *Ochrobactrum*⁶⁰. Sob a tendência atual, é

previsível que os investigadores venham a descobrir novas espécies de *Brucella* nos próximos anos. Por enquanto, não está totalmente esclarecida a existência de formulários de “transição” que possam preencher a lacuna filogenética existente entre as chamadas espécies clássicas e a novas espécies emergentes de *Brucella*. Da mesma forma, não se sabe se os intermediários *Brucella/Ochrobactrum* poderão vir a ser descobertos. No entanto, alguns autores propuseram a combinação do gênero *Brucella* e do gênero *Ochrobactrum*, num único gênero de *Brucella* ⁶¹. Por exemplo, *Ochrobactrum ciceri*, isolado de grão-de-bico tornar-se-ia “*Brucella cicero*” e *Ochrobactrum gallinifaecis*, isolado de fezes de galinha, seria “*Brucella gallinifaecis*”. Em qualquer caso, são necessárias mais investigações no âmbito da taxonomia para resolver estas questões.

2.3 Patogenicidade e Resposta Imunitária

As bactérias do gênero *Brucella* spp. podem estabelecer-se e causar doenças crônicas tanto em seres humanos como em animais. São agentes patogênicos intracelulares facultativos, capazes de resistir ao mecanismo de morte induzida por neutrófilos, replicando-se dentro de macrófagos e fagócitos “não profissionais”, mantendo uma interação duradoura com as células hospedeiras ⁶². Estas bactérias translocam-se através da camada do epitélio da mucosa, onde são endocitadas por macrófagos e por células dendríticas. Dentro dos macrófagos, as células de *Brucella* spp. sobrevivem e multiplicam-se, inibindo a fusão fagossoma-lisossoma, permitindo assim que as bactérias acumuladas sejam disseminadas para outras células hospedeiras ^{63,64}. O mecanismo subjacente à entrada de *Brucella* spp. nas células hospedeiras ainda não foi caracterizado ⁶⁵, mas a sua capacidade de sobreviver e replicar-se com sucesso dentro de diferentes células hospedeiras explica a sua patogenicidade. A replicação extensiva destas bactérias em trofoblastos placentários está diretamente associada ao aborto nos seus hospedeiros preferenciais, e a persistência deste agente patogênico em macrófagos conduz a infeções crônicas, que são uma característica de brucelose tanto em humanos como em animais ⁶⁵⁻⁶⁸.

Vários estudos *in vitro* foram realizados para que se compreenda melhor os passos de adesão, internalização, tráfico intracelular, sobrevivência e replicação de *Brucella* em hospedeiros suscetíveis. Após a fixação destas bactérias à superfície das células epiteliais da mucosa, é induzido um mecanismo de fecho para que ocorra a internalização. Esta ligação promove a ativação de pequenos GTPases, que provocam uma cascata de sinalização, reorganizando o citoesqueleto de actina e conseqüentemente, induzem um rearranjo da membrana da célula hospedeira, aumentando a invasão do agente patogênico. *Brucella* spp. sobrevive e reproduz-se dentro de células fagocitárias não profissionais até 72 horas *in vitro*, movendo-se através do epitélio *in vivo*, subvertendo a função da barreira epitelial da mucosa, facilitando a migração através da barreira epitelial desta bactéria ⁶⁴. Em paralelo, esta interação dá início a uma resposta imunitária inata mínima, com fraca atividade pró-inflamatória ⁶⁹. Dentro das células mononucleares fagocíticas, *Brucella* aglomera-se num vacúolo especial (*Brucella – containing vacuole*; BCV), modifica o tráfico intracelular e transforma o BCV num compartimento replicador ^{70,71}.

O sistema de vigilância imunológica inato consiste num conjunto de mecanismos que permitem ao hospedeiro reconhecer a presença de bactérias, capaz de distinguir *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), através de recetores de reconhecimento de agentes patogênicos. Estes recetores podem ser encontrados nas membranas celulares (*Toll-Like Receptors*; TLRs) ou no citosol (*NOD-like Receptors*; NLRs) e possuem a capacidade de detetar produtos bacterianos, tais como o LPS, ácidos lipoteicos, lipoproteínas e flagenina, levando à ativação da resposta inflamatória. Como agentes patogênicos bem-sucedidos, as bactérias do gênero *Brucella* desenvolveram mecanismos passivos a ativos para evitar a sua deteção tanto por TLRs como por NLRs, a fim de persistirem e causarem uma infeção duradoura ⁷².

3. Epidemiologia

A brucelose é a zoonose bacteriana mais comum em todo o mundo, sendo notificados mais de 500 000 novos casos anualmente, no entanto, é classificada como uma das sete doenças mais negligenciadas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) ⁷². Durante as últimas décadas, a epidemiologia da brucelose foi alterada de forma significativa, como consequência da emergência de novos surtos globais em associação com grandes eventos políticos/históricos. A epidemiologia desta doença foi então alterada através do controlo bem-sucedido da doença em muitas zonas do Mediterrâneo e através do encaminhamento de dados epidemiológicos de países onde a brucelose era endêmica, embora numa proporção desconhecida ^{73,74}.

A maioria dos casos de brucelose são registados em países mediterrânicos, América do Sul e Central, África, Ásia, Subcontinente Indiano, Europa Oriental e Médio Oriente ⁷³. O Médio Oriente é considerado uma área endêmica para esta doença, em que cinco dos dez países com incidência mais alta de brucelose a encontrarem-se nesta região, sendo a Síria o país com maior incidência a nível global. Na Ásia Central e Ocidental, a prevalência da doença é igualmente alta, com a Mongólia a ser o segundo país com maior incidência. A China viu um declínio da doença até ao ano de 1994, devido a um programa de vacinação massivo que decorreu entre 1964 e 1976, no entanto, ao longo dos últimos anos tem-se vindo a registar um aumento do número de casos reportados na região ⁷³. Em África a brucelose é considerada endêmica nas regiões do norte do continente, mas na África subsariana os dados são limitados, embora haja surtos reportados em alguns países. Na América Latina, o México possui um dos reservatórios de brucelose humana, e na América Central, embora a brucelose animal afete toda a região, não é endêmica para a brucelose humana (com exceção do Guatemala e do Panamá). Já a América do Sul é uma zona endêmica de brucelose humana ^{73,74}. Na **Figura I.2** pode ver-se a incidência de brucelose humana a nível global, nos anos de 2000 até 2021.

Na Europa os casos de brucelose humana têm manifestado uma tendência decrescente, e devido a programas de erradicação, países como a Áustria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Eslováquia, Suécia, Reino Unido, Noruega e Suíça são atualmente considerados países livres de brucelose, e os casos reportados são importados ⁷⁵.

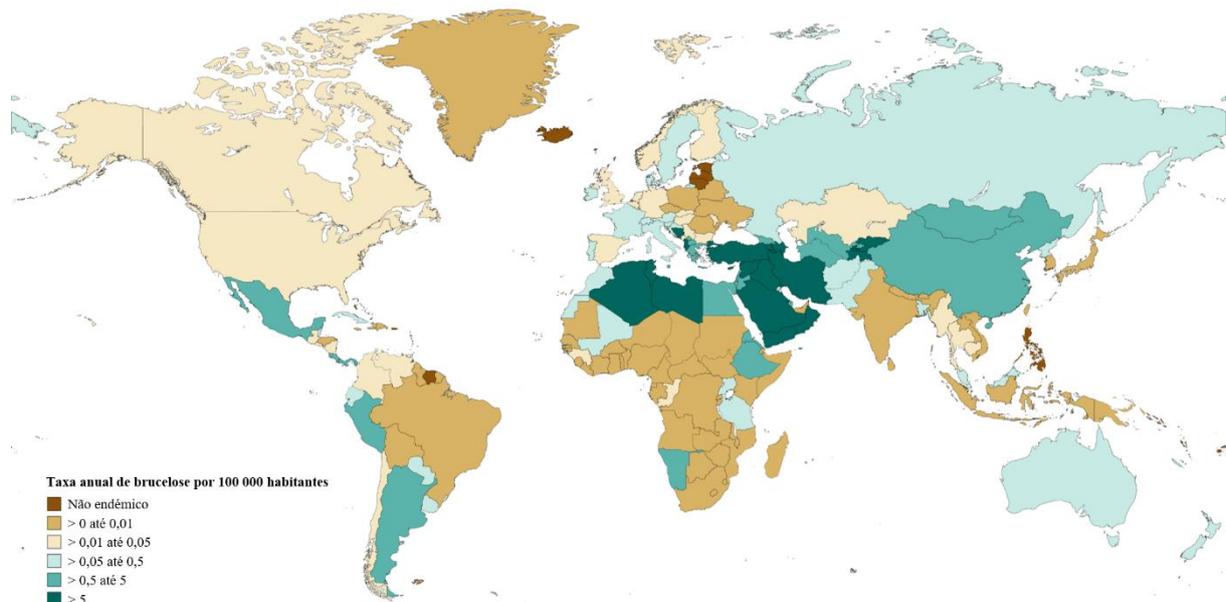


Figura I.2 – Taxa anual de brucelose por 100 000 habitantes entre os anos 2000 e 2021 (Adaptado de *Global Infectious Diseases and Epidemiology Network*, GIDEON, 2021).

Em 2017, o número de casos notificados de brucelose humana diminuiu para o nível mais baixo desde o início da vigilância a nível da União Europeia (UE) em 2007 (**Figura I.3**). Tal como nos anos anteriores, as taxas mais elevadas de casos adquiridos domesticamente na União Europeia/Espaço Económico Europeu (UE/EEE) foram comunicadas pela Grécia, Itália, Portugal e Espanha, e apesar de todos os esforços de eliminação da brucelose nos animais, esta continua a ser uma doença endémica nos seres humanos nestas regiões. Nos últimos 20 anos foi notificada uma diminuição global de casos de todas as regiões de Itália, mas a brucelose continua a ser um problema de saúde pública importante, particularmente no sul do país, onde 89% dos casos anuais são notificados ⁷⁶. Em Portugal a brucelose humana é uma doença de notificação obrigatória, havendo casos reportados em todas as regiões do continente ⁷⁷.

A distribuição geográfica da brucelose humana está em constante mudança, com o aparecimento e reemergência de novos surtos a nível mundial. A incidência desta doença replica a dinâmica de uma sociedade global em mudança, refletida pelas suas políticas sociais, culturais e económicas, fazendo com que o controlo e erradicação da brucelose seja um desafio constante. Esta doença afeta o bem-estar das populações, uma vez que causa um impacto económico nas explorações agropecuárias com o aborto de fêmeas grávidas, a redução da produção de leite e a ocorrência de infertilidade em animais infetados ⁷³. Estes prejuízos económicos traduzem-se na diminuição da qualidade de vida das populações, sobretudo nas zonas rurais onde o contacto com animais e o consumo de produtos alimentares de origem animal é menos controlado ²¹. A incidência de brucelose em humanos depende da ocorrência da mesma num reservatório animal, quer doméstico quer selvagem ⁴. A ocorrência da doença em zonas endémicas depende de vários fatores: hábitos alimentares; métodos de processamento de leite e produtos derivados; práticas pecuárias e de higiene ambiental; medidas de prevenção

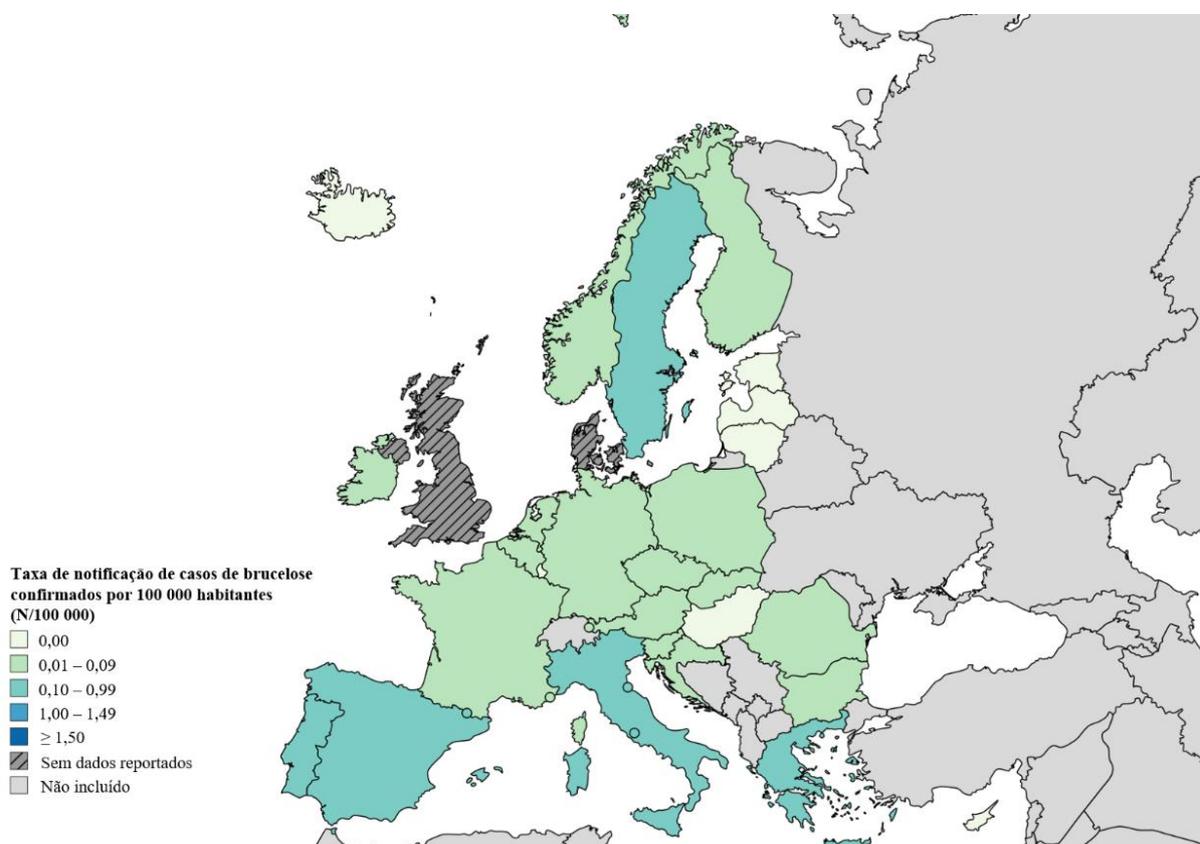


Figura I.3 - Taxa de notificação de casos de brucelose confirmados por 100 000 habitantes na UE/EEE, no ano de 2017. (Adaptado de ECDC, Annual Epidemiological Report for 2017, 2021).

insuficientes tal como programas de controlo inadequados; e também o transporte de animais de forma não controlada através das fronteiras ⁷⁸.

4. Brucelose Humana

4.1 Transmissão

As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* são consideradas as espécies mais patogénicas para o humano, estando classificadas como categoria B de bioterrorismo segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), devido à sua capacidade de formar aerossóis e da sua fácil disseminação e infeção ^{14,79}. *Brucella* spp. pode entrar no organismo humano através de inalação, ingestão, contacto com a mucosa ou por ferimentos na pele ⁸⁰. Os possíveis meios de aquisição de brucelose incluem infeção através de um ambiente contaminado, através de produtos alimentares contaminados e, embora muito raro, transmissão pessoa-a-pessoa, a qual envolve transplantes de medula óssea, transfusões de sangue ou contacto sexual entre indivíduos. A transmissão através de produtos alimentares contaminados é a forma mais comum de infeção entre as populações urbanas, como a ingestão de leite fresco ou laticínios e seus derivados não pasteurizados ¹⁷. As bactérias de *Brucella* spp. podem sobreviver durante longos períodos em poeiras, excrementos, água, lama, entre outros, e a inalação de partículas contaminadas nestes ambientes pode resultar da exposição a poeiras contaminadas ou através de excremento seco ¹⁷.

Além de ser uma doença infecciosa, a brucelose humana é também considerada uma doença ocupacional, porque ocorre normalmente associada a atividades profissionais que expõem os trabalhadores a este microrganismo ⁸¹. Certas profissões estão, assim, associadas a um elevado risco de infeção por brucelose, sendo estas pessoas agricultores, trabalhadores agrícolas, tratadores de animais, criadores, pastores e tosquiadores que trabalham com animais de quinta, especialmente bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Os veterinários, trabalhadores de matadouros e talhantes estão em risco através do contacto direto com animais infetados ou através da exposição a um ambiente fortemente contaminado. Também a nível da indústria pecuária, processamento de carne e produção de vacinas podemos encontrar uma maior taxa de infeção, no entanto, a exposição a microrganismos do género *Brucella* pode ser evitada mantendo uma correta higienização do espaço e utilizando equipamento de proteção ⁸².

4.2 Manifestações Clínicas e Terapêutica

Embora a brucelose em seres humanos raramente seja fatal, pode causar efeitos debilitantes e incapacitantes no indivíduo infetado, uma vez que se trata de uma doença sistémica que pode afetar qualquer órgão ou sistema, de forma subaguda, aguda ou crónica, consoante a duração dos sintomas ^{80,83}. Os doentes infetados por este microrganismo podem apresentar quadros clínicos distintos, consoante as espécies em causa, o seu modo de transmissão, a resposta imunitária do hospedeiro, quais os órgãos em causa e o estágio da doença, resultando numa redução da eficácia do diagnóstico ^{4,84,85}. A infeção por *Brucella* spp. pode ser assintomática ou sintomática, sendo as manifestações clínicas mais comuns o aparecimento de febre, suor, fadiga, indisposição, perda de peso, cefaleia e mialgias ^{84,86}. A brucelose aguda e crónica pode levar a complicações em múltiplos sistemas, sendo as mais comuns artrite, espondilite, epidídimo-orquite e fadiga crónica. Os sinais neurológicos ocorrem em 5% dos casos e podem incluir alterações de personalidade, meningite, encefalite e neuropatia periférica ⁸⁷. A endocardite é uma das complicações mais graves, e é frequentemente a causa de morte nos casos fatais. A mortalidade associada a esta doença é baixa, estando diretamente associada a um diagnóstico tardio,

uma vez que a maioria dos sintomas são pouco específicos, o que faz com que seja difícil distinguir a brucelose humana de outras doenças, como a tuberculose, a malária, a mononucleose infecciosa, entre outras ^{7,21}.

A antibioterapia na brucelose produz alívio da sintomatologia, diminui a duração da doença e reduz a incidência de complicações. As bactérias do género *Brucella* são microrganismos intracelulares, o que requer antibióticos com boa penetração a nível dos macrófagos e que possam atuar num ambiente intracelular ácido ²⁷. A escolha do regime e duração da terapia antimicrobiana deve ter em conta o local da infeção e as condições subjacentes do doente (idade, gravidez e gravidade do quadro clínico) ⁸⁸. Os tratamentos com duração inferior a quatro semanas apresentam um elevado risco de recaída, assim, é recomendada a combinação de antibióticos para uma duração mais longa de terapia durante, pelo menos, seis semanas ²⁰.

Em 1986, a OMS lançou recomendações para a utilização de doxiciclina combinada com rifampicina ou estreptomicina no tratamento da brucelose humana ²⁰. A maioria dos indivíduos com doença aguda responde de modo favorável ao esquema terapêutico recomendado pela OMS, mas pacientes com doença focalizada podem necessitar de terapias com maior duração, dependendo da sua evolução clínica. Para grávidas e para crianças com menos de oito anos de idade, uma vez que é desaconselhado o uso de doxiciclina e estreptomicina, opta-se por um esquema que combina cotrimoxazol com rifampicina ou aminoglicosídeo, durante oito a 12 semanas ⁸⁹. Os sintomas de brucelose desaparecem, geralmente, após os primeiros quatro a 14 dias de antibioterapia, mas esta não deve ser interrompida. Após o início do tratamento pode ocorrer um agravamento agudo ou intenso da sintomatologia, que é transitório e não requer interrupção terapêutica. Os doentes devem ser seguidos, clínica e serologicamente, de três em três meses ou de seis em seis meses, uma vez que as sinalizações tardias são relativamente frequentes ²⁷.

O isolamento de estirpes resistentes de *Brucella* evidencia novas dificuldades na gestão da terapia antimicrobiana. Tanto a dupla terapia (doxiciclina e rifampicina) como a tripla terapia (doxiciclina, rifampicina e gentamicina) têm sido administradas, e a lógica subjacente à utilização de uma combinação de três antibióticos reside na possibilidade de reduzir o risco de recorrência da brucelose ⁹⁰. O tempo do diagnóstico é, no entanto, crucial para escolher qual o melhor regime de antibioterapia e evitar complicações.

4.3 Diagnóstico

A sintomatologia da brucelose é, muitas vezes, inespecífica, pelo que é importante quando ocorre uma suspeita clínica obter um histórico detalhado, que inclua a ocupação do paciente, o seu contacto com animais, se realizou viagens para regiões onde a doença é endémica e se houve ingestão de alimentos de risco (produtos lácteos não pasteurizados, por exemplo) ²⁷. As análises hematológicas de rotina utilizadas no diagnóstico de brucelose são, principalmente, o hemograma completo, determinação da taxa de sedimentação dos eritrócitos e os testes de função hepática. No entanto, os resultados destes testes não são específicos, sendo variáveis e podendo sobrepor-se a outras doenças, levando a um diagnóstico incorreto ¹². Deve então optar-se pela realização de testes laboratoriais mais específicos, e o conhecimento das vantagens e limitações de cada teste garante uma aplicação e interpretação mais adequada ⁷.

O diagnóstico de uma suspeita clínica de brucelose requer testes de diagnóstico laboratorial, que podem ser baseados em métodos diretos como o isolamento do agente (cultura), a deteção de ácidos

nucleicos (técnicas moleculares), ou por métodos indiretos, que se baseiam na análise da resposta imunológica do paciente (testes serológicos) ⁷. De forma a obter um diagnóstico eficiente e correto, os testes de detecção de *Brucella* spp. devem ser rápidos, específicos e com elevada sensibilidade ⁹.

4.3.1 Cultura

O isolamento de *Brucella* spp., apesar de ser considerado o teste de referência para o diagnóstico de brucelose, requer longos períodos de incubação e raramente tem o sucesso pretendido. A cultura do microrganismo, quando positiva, fornece um diagnóstico definitivo, e é essencial para determinar a suscetibilidade antimicrobiana e realizar a tipagem da estirpe ⁷.

Brucella spp. pode ser isolada do sangue, da medula óssea ou, mais raramente, de outros líquidos orgânicos, como o líquido céfalo-raquidiano, líquido sinovial ou pus de abscessos ²⁷, no entanto, este não é um método de rastreio prático, porque para além de exigir períodos de incubação da cultura relativamente longos, *Brucella* é classificada como agente de grupo de risco biológico 3, o que implica que este método de diagnóstico tenha que ser realizado em laboratórios de Biossegurança de Nível 3 (BSL-3).

4.3.2 Testes Serológicos

Os testes serológicos são utilizados de modo mais frequente que os testes de cultura, no entanto, são testes poucos específicos, principalmente em áreas onde a doença é endémica ou quando aplicados no diagnóstico de brucelose em profissionais de saúde expostos a esta bactéria, uma vez que os resultados podem originar falsos-positivos ⁹¹. Os testes serológicos de aglutinação baseiam-se na reação entre os anticorpos e o LPS, pois é o antigénio determinante neste tipo de técnicas. No entanto, há que ter em atenção que as cadeias laterais O-específicas pertencentes ao LPS são consideradas responsáveis pela ocorrência de reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas, como *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Vibrio cholerae*, dificultando assim o diagnóstico ^{7,92}.

Vários testes serológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da brucelose humana. O Teste de Aglutinação Sérica (TAS, ou reação de Wright), continua a ser o método de referência para o diagnóstico serológico da brucelose humana, ao qual os outros testes são comparados. No entanto, é um teste demorado que apresenta resultados ambíguos na fase crónica da doença ⁹³. O Teste de Rosa Bengala é um dos testes realizados com mais frequência, e baseia-se numa reação de aglutinação em que o antigénio é corado com o corante rosa bengala. É um método de rastreio rápido (leva entre 5-10 min) e produz resultados relativamente fiáveis em doentes na fase aguda da doença. No entanto, apresenta elevados resultados falsos-negativos em casos crónicos devendo, por esse motivo, ser confirmado por outros testes ⁹³. A Reação de Coombs permite a detecção de anticorpos IgG e IgA não aglutinantes anti-*Brucella*, podendo ser utilizado como complemento do TAS, sendo muito sensível em casos de cronicidade e casos de recaídas. A Reação de Imuncaptura é uma técnica alternativa à Reação de Wright ou à Reação de Coombs, pois deteta anticorpos totais e apresenta resultados fiáveis independente do estágio da infeção do paciente. O método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica utilizada em casos complicados, crónicos ou focalizados, e deteta imunoglobulinas específicas e totais, como IgG, IgM e IgA, e é um teste rápido (4-6 h), com alta sensibilidade e especificidade ⁹³.

Normalmente, a sensibilidade dos testes serológicos varia entre 65-95%, mas a especificidade em regiões onde a brucelose é endêmica é baixa, uma vez que grande parte da população tem contacto direto com animais infetados ou produtos de origem animal, desenvolvendo e mantendo anticorpos contra *Brucella*, mesmo que não se verifique infecção ativa. Para além da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, os testes serológicos demonstram ainda pouca sensibilidade nos estádios iniciais da doença, uma vez que os níveis de anticorpos são baixos. Estes testes de diagnóstico possuem ainda um valor limitado na deteção da doença em indivíduos que ou já foram tratados para a brucelose, ou que são suspeitos de recaída ⁹⁴⁻⁹⁶.

4.3.3 Técnicas Moleculares

A rotina de identificação e diferenciação das espécies de *Brucella* é baseada, tipicamente, nos traços fenotípicos deste microrganismo, contudo, este processo é moroso e requer técnicos experientes, estando associado a um elevado risco de infecção adquirida em laboratório ⁹⁷. Com o intuito de superar estas dificuldades foram estabelecidos vários ensaios de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tanto convencionais como em tempo real, mesmo havendo elevados graus de semelhança genética entre as diferentes espécies do género *Brucella*. Através de técnicas de PCR convencional e de multiplex PCR, é possível identificar os isolados de *Brucella* até ao nível da espécie. A maioria das técnicas desenvolvidas utiliza *primers* que têm como alvo sequências do RNA 16S, e genes de diferentes proteínas da membrana externa ⁹³. As técnicas de PCR podem ser utilizadas para detetar DNA de *Brucella* em culturas puras ou a partir de tecidos e fluidos biológicos e, independentemente do estágio de infecção, estas técnicas são mais específicas que as hemoculturas e os testes serológicos ⁹⁴.

O ensaio de multiplex PCR designado AMOS PCR (em que AMOS é o acrónimo de “abortus, melitensis, ovis, suis”) é capaz de identificar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* ao nível do biovar, recorrendo à utilização de uma combinação de diferentes *primers*. Apesar de ser uma técnica com resultados fiáveis, é um método que necessita de pelo menos 5-6 h para ser executado e que requer um manuseamento dos produtos de PCR após a amplificação, o que pode originar contaminações. Para uma deteção rápida, sensível e precisa de *Brucella* spp. foi escolhido como alvo o elemento de inserção múltipla IS711, por ser estável em número e posição nos cromossomas de *Brucella* ⁹⁷. Também foi desenvolvido um PCR singleplex para realizar diferenciação de espécies, que se baseia num *loci* genético único de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. De um modo geral, os ensaios moleculares apresentam um bom potencial ao nível da investigação e diagnóstico de doentes com brucelose, no entanto, é necessária uma maior padronização e otimização para alcançar resultados consistentes e fiáveis, antes que estas técnicas sejam incorporadas em análises laboratoriais de rotina ⁹⁸. A simples identificação do género e, em alguns casos, da espécie através de ensaios de PCR, é adequada para efeitos de diagnóstico de doença humana/animal, ou para a identificação de contaminação alimentar, mas não é a ideal para o rastreio de surtos ou de ataques de bioterrorismo. Para alcançar estes objetivos são necessárias abordagens baseadas na sequenciação de todo o genoma, pois possuem um maior poder discriminatório ⁹⁹.

5. Métodos de Tipagem e Caracterização de Estirpes de *Brucella* spp.

As técnicas moleculares, para além da importância que constituem no diagnóstico de *Brucella* spp., são utilizadas na sua tipagem e caracterização molecular, podendo ser utilizadas em estudos de diversidade genética, tanto num contexto evolutivo como na vigilância epidemiológica e investigação em regiões com elevada incidência de brucelose ⁸⁴. No entanto, a discriminação entre as várias espécies

de *Brucella* tem-se revelado uma tarefa complicada, uma vez que a homologia existente entre as espécies deste género é superior a 90%, mostrando a conservação genética destas bactérias ^{78,80,100}.

A evolução da tecnologia e a possibilidade de sequenciação de genomas completos de *Brucella* spp. abriu caminho para o desenvolvimento de novas técnicas de tipagem molecular tais como MLST, análise de SNPs e MLVA. Estas técnicas permitem a identificação e diferenciação de *Brucella* a nível da espécie, biovar e até mesmo da estirpe, podendo ser utilizados para estudar a diversidade genética entre as várias espécies do género *Brucella* num contexto evolutivo ou em cenários de surto ⁴⁹. De um modo geral, a existência de programas de vigilância eficientes e fiáveis são essenciais para a deteção e controlo de surtos, e dependem em grande medida da recolha e acesso a dados epidemiológicos. No entanto, as investigações epidemiológicas dependem da disponibilidade de métodos eficazes de tipagem molecular, que permitam aos laboratórios de saúde pública identificar e rastrear um surto até à sua fonte.

5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

O PCR é uma reação em cadeia que permite amplificar de modo exponencial quantidades mínimas de DNA, resultando numa quantidade de produto detetável. A reação de PCR necessita da sequência de DNA que se pretende amplificar, de um par de *primers*, de nucleótidos e de uma enzima de síntese de DNA (DNA polimerase), que deve ser resistente ao calor, de maneira a resistir às temperaturas utilizadas durante cada ciclo de PCR para desnaturar o DNA. Já os *primers* devem ser sintetizados de modo a serem complementares às extremidades 3' do segmento de DNA molde ¹⁰¹. A reação de PCR consiste numa série de ciclos, cada um dos quais envolve reações efetuadas a temperaturas diferentes, sendo estas a desnaturação do DNA, seguida da hibridação dos *primers* e, por último, da síntese de DNA (ou extensão). Cada ciclo é repetido várias vezes no termociclador, sem intervenção manual, e o resultado é a amplificação das sequências de DNA delimitadas pelo par de *primers* utilizados na reação. Durante cada ciclo da reação de PCR, cada n ciclos leva à produção de 2ⁿ moléculas de DNA, sendo esta quantidade suficiente para que o produto final possa ser diretamente visualizado através de um gel de agarose ¹⁰¹.

A análise dos produtos resultantes da reação de PCR é, normalmente, feita através de eletroforese em gel de agarose. A separação por eletroforese permite estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos, DNA ou RNA. O gel de agarose é colocado numa tina de eletroforese, imerso em tampão, entre dois elétrodos posicionados de modo paralelo à fileira dos poços que constituem o gel. Os produtos de PCR são colocados nos poços do gel, e através da aplicação de um campo elétrico, as moléculas 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 e, dependendo da percentagem de agarose, deixa migrar mais facilmente as moléculas mais pequenas, em relação às maiores. Deste modo é possível estimar o tamanho de fragmentos de DNA através da comparação da sua migração no gel, com a migração de fragmentos cujo tamanho é conhecido ¹⁰¹.

5.2 Sequenciação de DNA

A determinação da sequência de nucleótidos que compõem um fragmento de DNA clonado representa um dos processos finais da análise de DNA, sendo que um dos métodos laboratoriais mais comuns de sequenciação de DNA é conhecido como método de Sanger ou método de terminação de cadeias. Este método consiste numa reação enzimática que envolve a síntese de uma série de cadeias simples de DNA, utilizando como molde a cadeia de DNA que se pretende sequenciar, através da ação

da DNA polimerase. A síntese começa num ponto definido, determinado por um *primer*, e termina na incorporação de nucleótidos terminados. Estes nucleótidos são derivados didesoxi dos nucleótidos normais que, ao não possuírem um grupo hidroxilo na posição 3' da molécula de desoxirribose, impedem as ligações fosfodiéstericas do DNA. Os quatro terminadores são designados, abreviadamente, por ddA, ddC, ddG e ddT, cada um marcado com um fluorocromo diferente. As diferentes fluorescências são detetadas num aparelho, o Sequenciador Automático, permitindo a leitura das sequências ¹⁰².

5.3 *Multilocus Sequencing Typing* (MLST)

O MLST combina vários desenvolvimentos técnicos e conceptuais das duas últimas décadas do século XX, a fim de fornecer um método universal, portátil e preciso para a tipagem de bactérias ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Este método de tipagem baseia-se em sequências de DNA de espécies bacterianas para diferenciar estirpes e identificar linhagens clonais, envolvendo a amplificação de genes constitutivos por PCR, seguido de sequenciação de DNA. São utilizados genes constitutivos uma vez que são conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas do organismo e são expressos em níveis relativamente constantes ¹⁰³. O método de MLST tornou-se a principal abordagem aplicada ao estudo da epidemiologia global de bactérias e é frequentemente utilizado para estudos filogenéticos. A tipagem por MLST envolve a sequenciação de fragmentos curtos (aproximadamente 500 pares de bases) de um número de genes constitutivos que estão sujeitos a seleção e evolução, dentro dos quais a sua variação é quase nula ¹⁰⁶. As sequências de DNA são comparadas e as análises filogenéticas são realizadas tendo por base matrizes de semelhança. Assim, as diferenças existentes nos nucleótidos de um número variável de genes permitem fazer a distinção entre genótipos ou sub-genótipos, dependendo do grau de discriminação considerado.

O método de MLST tem sido amplamente utilizado na descrição da evolução genética e da estrutura populacional de muitas espécies bacterianas, particularmente espécies patogénicas ¹⁰⁷. Possui várias vantagens em relação a outros métodos de tipagem, pois utiliza dados de sequências e pode, assim, detetar alterações a nível do DNA que não são aparentes através das abordagens fenotípicas. Para além disso, é uma técnica genérica que pode ser facilmente reproduzida, não requerendo acesso a reagentes especializados ou formação. Os métodos modernos de sequenciação direta de nucleótidos, baseados em PCR, não requerem acesso direto a isolados bacterianos vivos ou DNA genómico de alta qualidade, esta técnica pode ser realizada através de suspensões celulares, evitando as dificuldades associadas ao transporte e manipulação de agentes patogénicos. Os dados gerados por MLST são totalmente portáteis entre laboratórios e podem ser partilhados para a comunidade científica através da Internet, havendo a possibilidade de padronização das abordagens a fim de otimizar este método de tipagem ^{104,108}.

A primeira aplicação de MLST para análise filogenética do género *Brucella* foi publicada em 2007, e foram examinadas sequências de DNA parciais de nove genes a partir de 160 isolados ⁵². A diversidade genética global confirmou a uniformidade deste género, que possui apenas 1,5% de locais polimórficos, representando 27 tipos de sequências distintas. Tendo em conta a natureza conservada dos genomas de *Brucella*, é provável que o MLST não seja suficiente para estudos epidemiológicos locais. Ferramentas como a tipagem baseada em *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) ou a variação de marcadores de evolução rápida conseguem fornecer mais informação neste tipo de situações. Contudo, a natureza não ambígua e definida dos métodos de tipagem é ideal para abordar a estrutura genética global da população de *Brucella* ⁵².

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

O desafio de trabalhar com *Brucella* spp. reside no facto de este género de bactérias ser geneticamente monomórfico. Os estudos de hibridização DNA-DNA revelam mais de 90% de homologia entre as seis espécies clássicas, e mesmo as espécies distintamente relacionadas são separadas por poucos polimorfismos e, especialmente dentro das espécies, as estirpes são difíceis de diferenciar através de técnicas genéticas. Assim, uma das abordagens mais reconhecidas para obter uma discriminação em *Brucella* é o MLVA ¹⁰.

O MLVA é um ensaio que utiliza marcadores moleculares altamente discriminatórios, os VNTRs, compostos por cópias de uma unidade elementar existentes no genoma bacteriano ¹⁰⁹, permitindo a caracterização de estirpes tendo em conta a variação do número de repetições em *tandem* num determinado *locus*. A análise por MLVA tem sido utilizada na identificação e genotipagem de *Brucella*, uma vez que consegue distinguir isolados com origens muito próximas, e permite ainda determinar relações entre isolados de diferentes espécies de animais e humanos, sendo uma ferramenta bastante útil em estudos epidemiológicos. O MLVA é também eficiente na confirmação laboratorial de infeções, caracterização de surtos, identificação de genótipos com variados potenciais patogénicos e avaliação de estabilidade entre lotes de vacinas ^{59,110}.

Para *Brucella* foram publicados painéis de MLVA com 21, 16 e 15 *loci* (MLVA-21, MLVA-16 e MLVA-15) ^{109,111,112}. Os autores utilizam um subconjunto de *loci* que preserva os *clusters* correspondentes às espécies clássicas, compreendendo marcadores com unidades de repetição de nove pares de bases ou superiores (minissatélites) e marcadores com unidades de repetição de até oito pares de bases com um maior poder discriminatório (microsatélites) ⁵¹. A partir destes resultados, foi criada uma base de dados pública, baseada no esquema MLVA-16, com o objetivo de promover a criação de um mapa epidemiológico global de *Brucella* (<http://mlva.u-psud.fr/brucella/>) ¹¹³. Para permitir o desenvolvimento do ensaio com o esquema MLVA-16, foi realizada a tipagem de centenas de estirpes de *Brucella* ^{11,40,51,112}. Os 16 *loci* utilizados no ensaio MLVA-16 foram agrupados em três painéis, denominados painel 1 (oito *loci* constituídos por minissatélites), painel 2A (três *loci* constituídos por microsatélites) e painel 2B (cinco *loci* constituídos por microsatélites). O painel 1 demonstrou ser útil na identificação das espécies, enquanto os painéis 2A e 2B aumentam o poder discriminatório, permitindo a diferenciação ao nível da estirpe. A amplificação dos 16 *loci* selecionados é efetuada por PCR, para cada estirpe de *Brucella* que se quer estudar, e a análise dos produtos de PCR é feita por eletroforese em gel de agarose, de modo a determinar o tamanho de fragmentos de DNA amplificados que contêm as regiões VNTR de interesse. Através deste ensaio é assim possível estimar o número de cópias de cada repetição que corresponde a uma variação alélica, com recurso a uma tabela previamente publicada ⁵¹.

Os dados do MLVA podem ser facilmente gerados por PCR, e a análise dos produtos de PCR é realizada por eletroforese em gel de agarose, mas a comparação dos resultados entre laboratórios continua a ser um desafio, uma vez que algumas plataformas de análise de fragmentos (tais como a eletroforese em gel de agarose) são incapazes de resolver ambiguidades em determinados *loci* específicos ¹¹⁴. O protocolo subjacente ao ensaio MLVA-16 emprega um *singleplex* PCR e eletroforese em gel de agarose, no entanto, Garafolo e os seus colegas ¹¹³ conceberam, testaram e demonstraram um protocolo de MLVA-16 utilizando um *multiplex* PCR com eletroforese capilar com *primers* marcados. A análise MLVA foi desenvolvida para diversos microrganismos bacterianos, incluindo agentes de bioterrorismo tais como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*. Para estes agentes patogénicos, a estimativa do tamanho de fragmentos por eletroforese capilar é reconhecida como o método *gold standard*. No entanto, para *Brucella*, o

método *gold standard* utilizado para estimativa de fragmentos, através de dados obtidos pelo ensaio MLVA-16, é a eletroforese em gel de agarose. Embora este método seja relativamente barato, é um método moroso e não permite testar múltiplas estirpes, que pode ser até necessário para projetos de grande escala. Tendo esta situação em conta, a adoção de um novo sistema de tipagem de *Brucella* através de MLVA é de extrema importância, e a análise MLVA com eletroforese capilar é um método rápido de genotipagem de *Brucella*, podendo representar uma ferramenta poderosa de análise ¹¹³.

6. Objetivos

O trabalho desenvolvido ao longo desta Dissertação de Mestrado tem como objetivo aumentar o conhecimento sobre a doença brucelose em Portugal. Atualmente, apenas as espécies clássicas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) estão sujeitas ao controlo e estratégias de vigilância em animais domésticos na Europa. Outras espécies são potencialmente subdiagnosticadas e mal caracterizadas com poucos isolados ainda descritos. Para algumas dessas espécies, o potencial zoonótico não é conhecido ou não se encontra totalmente esclarecido, expondo as pessoas a um potencial risco de infeção. A espécie mais prevalente no Homem é *B. melitensis*, no entanto podem encontrar-se outras espécies em circulação, que não estão a ser procuradas ou investigadas.

Na primeira parte deste trabalho pretendeu-se estudar e identificar novas espécies de *Brucella* spp. em amostras humanas, estando inserida neste tópico a implementação de uma rede de vigilância para a brucelose humana, através do mapeamento de dados existentes, para que sejam estabelecidas as estirpes e/ou amostras biológicas das populações humanas com suspeita de infeção. Pretende-se uma caracterização das respostas serológicas, bem como a análise de amostras biológicas recorrendo a métodos diretos (testes rápidos de aglutinação, numa coleção de soros pertencentes à seroteca do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)), seguidos de PCR em tempo real, para identificação e caracterização das espécies de *Brucella* spp.

Na segunda parte deste trabalho, e com o objetivo de otimizar as técnicas de tipagem anteriormente utilizadas, pretende-se comparar a metodologia de MLVA tradicional com o MLVA *in silico*, obtido através da sequenciação de nova geração. A tipagem molecular de novas estirpes através da utilização da técnica de MLVA-16 permitirá o aumento do número de estirpes caracterizadas na base de dados de MLVA (<http://mlva.u-psud.fr/brucella/>). O conhecimento mais aprofundado do gênero *Brucella* é relevante na área de saúde pública, não só em Portugal, mas também em países onde a doença é endémica.

II. Identificação de novas espécies de *Brucella* spp.

Contextualização Teórica

Desde o final dos anos 90, foram isoladas de seres humanos, animais selvagens e fontes ambientais, várias novas espécies de *Brucella* spp., mostrando que existe uma gama de hospedeiros mais ampla, em termos de suscetibilidade a este microrganismo. Algumas destas espécies recentemente descritas são geneticamente e/ou fenotipicamente diferentes quando comparadas com as espécies clássicas, o que pode resultar em potenciais novas ameaças zoonóticas. No ano de 2017 foram descritos os primeiros casos ligados a *B. neotomae*, uma espécie que anteriormente havia sido considerada como não zoonótica¹¹⁵. A partir de dois casos independentes em humanos foi isolada uma espécie atípica, *Brucella inopinata*, no ano de 2010^{41,46}. Para além disso, nos últimos dez anos, foram detetados vários isolados de *Brucella* spp. a partir de animais selvagens na Europa (*B. microti* e *B. vulpis*)^{116,117}. Pode verificar-se que existe uma dimensão mais alargada da diversidade que se conhecia relativamente ao género *Brucella*, bem como uma maior gama de hospedeiros que são suscetíveis à sua infeção, observando-se também uma deteção desta bactéria em organismos pouco comuns, tais como roedores, anfíbios, morcegos e peixes^{48,117-119}. Estas espécies emergentes carecem de investigação, com o intuito de avaliar a sua distribuição geográfica, alcance do hospedeiro e potencial zoonótico, para que seja possível a comparação dos marcadores de virulência e persistência com os respetivos das espécies clássicas. Existe, assim, uma necessidade intrínseca de identificar os novos casos em animais e humanos, para que seja possível desenvolver um sistema mais robusto de deteção e identificação de *Brucella* spp.

O trabalho desenvolvido no presente capítulo desta Dissertação de Mestrado encontra-se inserido num projeto internacional designado “IDEMBRU: *Identification of emerging Brucella species: new threats for human and animals*”, que tem por base uma abordagem *One Health*, no qual participam várias instituições europeias. Este projeto foca-se, essencialmente, na potencial ameaça que as espécies emergentes de *Brucella* spp. possam constituir para a saúde pública a nível mundial, e tem como objetivo principal o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas de deteção e caracterização do género *Brucella*. Estas novas ameaças incluem tanto espécies atípicas emergentes, bem como espécies que se consideram clássicas, mas que possam ser identificadas em hospedeiros incomuns, tanto de animais, populações humanas, bem como associadas a padrões de consumo. Serão utilizados dados epidemiológicos, fenotípicos e genómicos, novos biomarcadores e características específicas com a finalidade de comparar as novas espécies de *Brucella* spp. com as espécies clássicas. Deste modo, será possível obter uma melhor elucidação das diferenças entre as novas espécies e as espécies clássicas, facilitando a avaliação do potencial zoonótico e, por consequência, a possibilidade de entender se estas espécies podem surgir como uma ameaça de saúde pública.

Materiais E Métodos

1. Material Biológico

O material biológico utilizado no procedimento experimental para a identificação de novas espécies de *Brucella* consistiu num conjunto de soros humanos da seroteca pertencente ao INSA, Departamento de Doenças Infeciosas (DDI), Laboratório de Imunologia das Doenças Infeciosas. O conjunto de soros pertence a indivíduos com suspeita de infeção com *Brucella* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Leptospira* sp., dos quais foram apenas selecionados aqueles cujo diagnóstico teve resultado negativo para os microrganismos acima mencionados, entre os anos de 2019 e 2020 (**Tabela S1**). Foram também selecionados os soros pertencentes a indivíduos cujo diagnóstico foi positivo para *Brucella* spp., nos anos de 2019, 2020 e início de 2021 (**Tabela S2**).

2. Teste de Aglutinação Rosa de Bengala

O teste de aglutinação Rosa de Bengala é um teste serológico que permite a determinação do título de anticorpos anti – *Brucella* em soro humano e é utilizado para o diagnóstico *in vitro* da brucelose, como teste de despiste pela sua rapidez (5-10 min), simplicidade e sensibilidade. Esta reação de aglutinação rápida em lâmina com antigénio ácido tamponado, corado com Rosa de Bengala, permite detetar precocemente aglutininas específicas da brucelose. O pH ácido da suspensão impede a aglutinação não específica das bactérias, sendo detetados na reação anticorpos aglutinantes das classes IgG, IgM e IgA. Este teste produz resultados relativamente fiáveis em doentes na fase aguda da doença, mas deve ser confirmado com outras provas bacteriológicas e serológicas. Se na amostra do soro em estudo existirem anticorpos específicos, eles irão ligar-se ao antigénio dando origem a uma aglutinação visível a olho nu. Caso contrário, o resultado é negativo e a mistura fica homogénea.

Para este procedimento foi utilizado o *kit Rose Bengal* da *Vircell Microbiologists* (referência RB001), constituído por 5 mL de uma suspensão ácida de *Brucella* inativada e corada com Rosa de Bengala, com fenol; 1 mL de soro de controlo positivo, com fenol; 1 mL de controlo negativo, com fenol; um conjunto de cartões de reação e varetas de mistura descartáveis. Na execução do teste, foi necessário deixar que os reagentes e as amostras atingissem a temperatura ambiente. Foi realizada a homogeneização da suspensão antigénica e foram utilizados 40 µL de amostra numa das células do

cartão de reação, adicionando a cada célula (próximo da amostra a analisar) uma gota da suspensão antigénica corada com Rosa de Bengala. Com o auxílio de uma vareta descartável, as duas gotas foram homogeneizadas de forma a cobrir toda a célula do cartão. O cartão foi agitado de forma manual durante 4 min, sendo no fim observada a presença ou ausência de aglutinação. A existência de aglutinação traduz-se numa reação positiva e indica a existência de anticorpos anti-*Brucella*, enquanto a ausência de aglutinação corresponde a uma reação negativa e sugere a ausência de anticorpos aglutinantes anti-*Brucella* (**Figura II.1**).

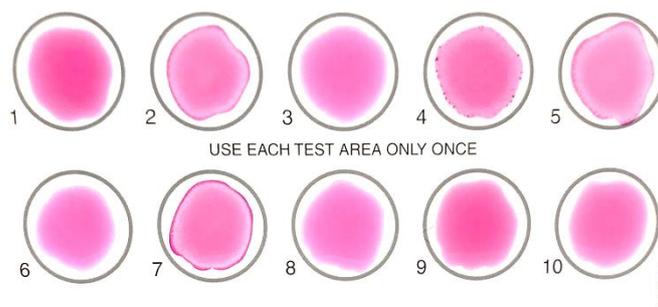


Figura II.1 –Cartão de reação com o reagente Rosa de Bengala. Pode observar-se uma reação positiva de aglutinação nas células 2, 4, 5 e 7, sendo as restantes um resultado negativo.

3. Extração de DNA

A extração de DNA a partir dos soros foi realizada com recurso ao *kit* de extração *QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)*, constituído por colunas *QIAamp Mini Spin*, proteinase K, reagentes, soluções tampão e tubos coletores de 2 mL. Para este procedimento foi adicionado num microtubo de 1,5 mL, 20 µL de proteinase K, 200 µL de amostra e 200 µL de tampão AL, homogeneizando no vórtex durante 15 s. Os tubos foram incubados a 56 °C durante 10 min para que ocorresse lise total. Foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%), voltando a homogeneizar no vórtex durante 15 s. A solução foi transferida para uma coluna *QIAamp Mini Spin* com um tubo coletor de 2 mL, e a coluna foi centrifugada durante 1 min a 8 000 r.p.m. Após a centrifugação, o tubo coletor com o eluído foi rejeitado e a coluna foi colocada num novo tubo coletor, à qual foram adicionados 500 µL de tampão AW1, centrifugando-se novamente durante 1 min a 8 000 r.p.m. O tubo coletor com o eluído foi rejeitado novamente, e a coluna foi colocada num novo tubo coletor, à qual foram adicionados 500 µL de tampão AW2, seguido de centrifugação durante 3 min a 14 000 r.p.m. O tubo coletor com o eluído foi rejeitado e, passando a coluna para um novo tubo coletor, foram adicionados 200 µL de tampão AE, deixando incubar à temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 min. Procedeu-se a uma última centrifugação durante 1 min a 8 000 r.p.m, de modo a recuperar o DNA para o tubo coletor. A solução final foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e o DNA foi armazenado a -20 °C.

4. PCR em tempo real (RT-PCR)

Para a deteção rápida, sensível e precisa de *Brucella* spp., foram escolhidos os elementos de inserção múltiplos IS711, uma vez que são conservados tanto em número como em posição nos cromossomas de *Brucella*^{97,120}, com a seguinte sequência de *primers* (5' → 3'): *primer forward* [GCTTGAAGCTTGCGGACAGT] e *primer reverse* [GGCCTACCGCTGCGAAT]. Para este procedimento experimental foi utilizado o *kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)*, constituído por *FastStart DNA Master SYBR Green I*, MgCl₂ e água (PCR Grade). As reações de amplificação de RT-PCR foram realizadas num volume final de 20 µL, com 15 µL de *Master Mix* e

5 µL de DNA total extraído. Como controlo positivo foi utilizado DNA da estirpe de referência *B. melitensis* 16M e como controlo negativo foi utilizado água. Foram utilizados capilares *LightCycler*® de 20 µL, aos quais foi adicionado a mix e o DNA, seguido de centrifugação a 3 000 r.p.m. por 5 s e foram colocados no *LightCycler*® 2.0 *Sample Carousel*. A reação de amplificação foi levada a cabo no *LightCycler*® 2.0 *Instrument*, nas seguintes condições: um ciclo a 95 °C durante 10 min, seguido de 55 ciclos a 60 °C durante 30 s, seguidos de um ciclo a 40 °C durante 30 s. Para análise dos resultados do PCR em tempo real foi utilizado o *LightCycler*® *Software Version 4.1 (Roche)*, para análise das curvas de amplificação.

5. Sequenciação de DNA

A sequenciação automática do DNA foi realizada no Departamento de Genética Humana, pela Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA. A sequenciação automática foi efetuada após um processo de purificação e sequenciação prévios. A purificação foi realizada com o reagente *ExoSAP*, constituído por 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 com a etapa de sequenciação. Para este procedimento foram adicionados 2 µL de reagente *ExoSAP* a 5 µL de produto de PCR, e a respetiva purificação foi realizada no termociclador *Veriti*® 96 *Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)* com um ciclo de 37 °C durante 15 min para incubação da enzima, e um segundo ciclo a 80 °C durante 15 min para inativação da mesma. Na reação de sequenciação cíclica foi utilizada uma mistura de reação que continha 5,5 µL de água, 0,5 µL de *primer IS7II forward* e 2 µL de *BigDye*® V.1.1. A 2 µL de produto de PCR foram adicionados 8 µL da mistura de reação, perfazendo um volume final de 10 µL. A sequenciação foi efetuada no termociclador *Veriti*® 96 *Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)* nas condições de um ciclo a 96 °C durante 30 s, seguido de 25 ciclos a 96 °C durante 30 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. As sequências obtidas pela sequenciação automática foram visualizadas no *Software Chromas LITE 2.1.1*.

Resultados

Para a identificação de novas espécies de *Brucella* spp. procedeu-se à realização do teste de aglutinação Rosa de Bengala. O teste foi realizado em 168 amostras de soro humano, selecionadas da seroteca pertencente ao INSA. Os soros selecionados pertencem a indivíduos com suspeita de infeção para *Brucella* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Leptospira* sp., cujo seu diagnóstico teve um resultado negativo (**Tabela S1**). Dos 168 soros submetidos ao teste de aglutinação Rosa de Bengala, apenas cinco amostras apresentaram um resultado positivo (amostras com número de requisição 364, 3 109, 5 836, 5 107 e 29 928). Foi realizada extração de DNA com recurso ao *kit* de extração *QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)*, para a realização de RT-PCR. Das cinco amostras que apresentaram resultado positivo no teste de aglutinação Rosa de Bengala, apenas três obtiveram um resultado positivo na reação de RT-PCR (amostras com número de requisição 364, 5 107 e 29 928).

Devido ao número reduzido de resultados positivos tanto no teste de aglutinação Rosa de Bengala, bem como na reação de RT-PCR, foi adotada uma nova abordagem, através da seleção de soros aleatórios. Os soros selecionados pertencem a indivíduos com suspeita de infeção para *Brucella* spp., *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Leptospira* sp., cujo seu diagnóstico teve um resultado negativo, e que apresentaram, igualmente, um resultado negativo no teste de aglutinação Rosa de Bengala. Ao todo, foram selecionados de modo aleatório 27 soros pertencentes à seroteca do INSA. Foi realizada extração de DNA com recurso ao *kit* de extração *QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)*, procedendo à realização de RT-PCR. Do total de 27 soros estudados, 18 apresentaram um resultado positivo com curvas de amplificação tardias (>35 ciclos), quando comparadas com o controlo positivo (**Figura II.2**). Deste modo, este procedimento terminou com um total de 21 amostras de soros humanos com resultado positivo para a deteção de *Brucella* spp. (**Tabela S3**).

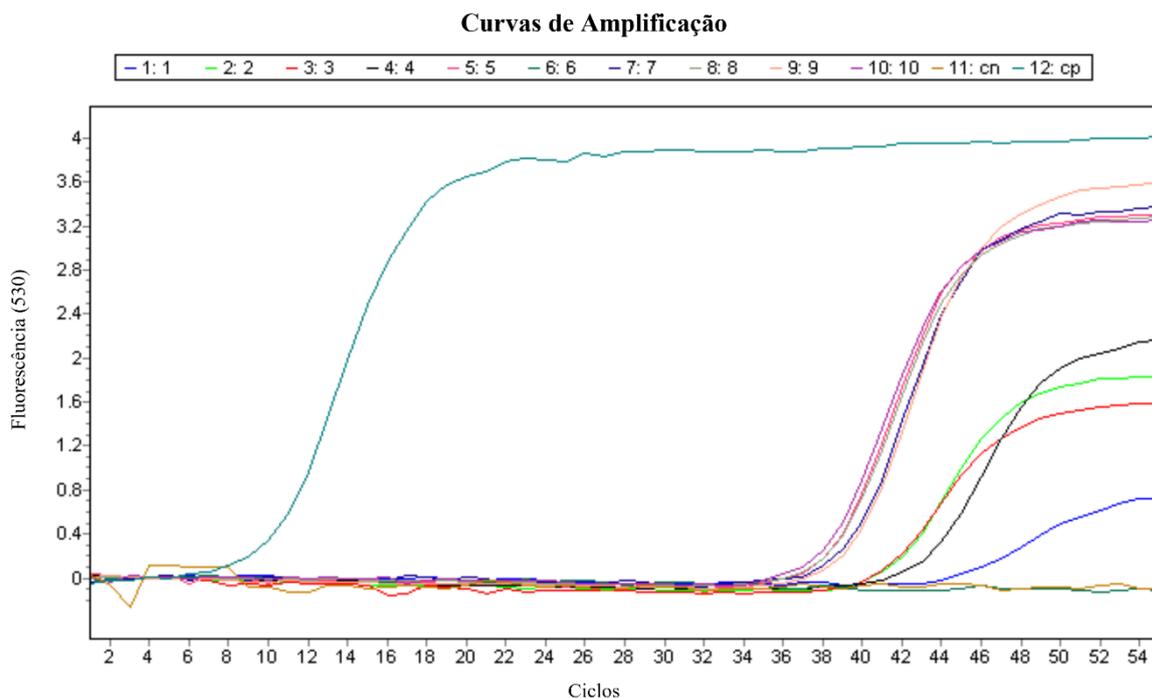


Figura II.2 - Curvas de amplificação obtidas numa das reações de RT-PCR. Para esta reação, as amostras foram numeradas de 1 a 12, aos quais correspondem os seguintes números de requisição dos soros em estudo: 1 - 572; 2 - 2756; 3 - 2757; 4 - 6089; 5 - 10558; 6 - 15068; 7 - 17853; 8 - 18235; 9 - 20035; 10 - 20593; 11 - Controlo Negativo (H₂O); e 12 - Controlo Positivo (estirpe de referência *Brucella melitensis* 16M).

Os produtos de PCR obtidos foram purificados e sequenciados, e os resultados visualizados através do *Software Chromas LITE 2.1.1.*, que permite observar a sequência de bases num cromatograma. As sequências obtidas podem ser visualizadas na **Tabela II.1**. Nas sequências apresentadas, “N” significa que a base correspondente pode igualmente ser uma Adenina, Timina, Citosina ou Guanina. Estes resultados demonstram que em nenhuma das amostras testadas é possível encontrar o genoma correspondente a *Brucella* spp., uma vez que para todas as amostras em teste não foi possível determinar qual o nucleótido incorporado nessa porção da sequência. Para os soros com número de requisição 572, 2 756, 2 757, 16 088 e 17 873 não foi possível determinar a sequência, devido à sobreposição dos picos de fluorescência no cromatograma.

Devido aos resultados que se verificaram pouco satisfatórios, foi realizada uma nova abordagem através da seleção de soros pertencentes à seroteca do INSA, com resultado positivo para infeção de *Brucella* spp. Foram assim seleccionados 27 soros humanos com resultado positivo para *Brucella* spp. (**Tabela S2**), tendo sido realizada extração de DNA e, de seguida, RT-PCR. Ao contrário do esperado, observou-se resultado negativo para todas as amostras de soros em estudo.

Uma vez que o elemento de inserção múltipla IS7II pode originar reações inespecíficas, foram seleccionados alguns *loci* utilizados na técnica de MLVA-16 de forma a garantir que estas amostras eram, de facto, negativas. Foi realizado um PCR convencional nas 21 amostras com resultado positivo para a reação de RT-PCR, utilizando os *loci* Bru08 e Bru16 do painel MLVA-16, onde não se verificou amplificação para nenhuma amostra, com exceção do controlo positivo (estirpe de referência *B. melitensis* 16M).

Tabela II.1 - Resultados das sequências obtidas para as 21 amostras através do *Software Chromas LITE 2.1.1*.

Requisição	Sequência
364	NNNGN NAGNNNNNNNNNNNNCTNNNNNNNNNTTNNNNNN
572	-
2 756	-
2 757	-
4 265	NNC NCNANCNNNNNNNNNNNNNTNGNGACTGNNNNNNCTTNNNNN
5 107	NNNG AGNNNNNNATNGNGACTGTCCNNNNCTTNNNN
6 089	NNNNNNNGNNNGNNNGNN NNNNNTNNNNGTAGNNNNNTANN
10 421	NNNG GCGGNAGGNNNTNNNNNN
10 558	NNNG NGCGGTAGNCCNNNNNN
12 138	NNNAG CGGNAGNNNNNNNNAN
12 933	NNNNNNNNNNNGNTNNNTNNNTNNNANNNNNNNNNNNNNNNNTTNNNGNNGNNNN NGCTTNN
13 337	NN NNNNNNNNNTATNCNCNNCTTNN
16 088	-
16 096	NNNNNNNNNNNTGTTGNNTTNTTCGCANCGGTAGNNNNNNNN
16 200	NNNNNNNNNTNNTNNNTNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNTTNTGATGTCCNNA N
17 853	NNANG GGTAGNNNNNTNN
17 873	-
18 235	NNNNNNNNNTGTTGNNTTNNNTCGCANCGGNAGNNNNNNNN
20 035	NNNGNNNNNTGTTGNNTTNTTCGCAGCGGNAGNNNNNN
20 593	NNNG CGGTAGTNNCNATTNGCAGCGGTAGNNNNNN
29 928	NNNG CGGTAGTNNCNATTNGCAGCGGTAGNNNNNN

A - Adenina; T - Timina; C - Citosina; G - Guanina; N - A, T, C ou G.

Discussão

A brucelose é uma zoonose altamente contagiosa, geralmente causada pela ingestão de leite não pasteurizado ou carne mal cozinhada, proveniente de animais infetados, ou pelo contacto próximo com secreções libertadas por estes animais. Durante muitos anos foram identificadas seis espécies “clássicas” de *Brucella*, mas, desde o final dos anos 90, várias novas espécies foram isoladas de seres humanos, animais selvagens e/ou fontes ambientais. Deste modo, verifica-se a existência de uma gama mais vasta de hospedeiros suscetíveis a este microrganismo, bem como o aparecimento de potenciais ameaças zoonóticas. Algumas destes espécies “emergentes” são geneticamente e/ou fenotipicamente atípicas quando comparadas com as espécies clássicas.

Em relação às espécies clássicas de *Brucella*, como *B. suis* e *B. melitensis*, estas circulam em reservatórios de vida selvagem, mas possuem potencial para se espalharem para outros hospedeiros, como animais domésticos e humanos, verificando-se casos de espécies a emergir na Europa Ocidental. Atualmente, apenas algumas espécies clássicas estão sujeitas a estratégias legais de controlo e vigilância em animais domésticos na Europa, o que representa um problema. Em consequência, estas espécies encontram-se potencialmente subdiagnosticadas na vida selvagem, sendo que as espécies de *Brucella* mais estudadas correspondem às que apresentam o maior risco de transmissão e maior grau de patogenicidade para os seres humanos, enquanto as restantes se encontram pouco caracterizadas. Os reservatórios emergentes das espécies clássicas podem estar ligados a novos padrões de consumo, ao desenvolvimento de práticas de produtos biológicos lácteos e crus, à importação de produtos de origem animal de diferentes origens e/ou a percursos emergentes de movimentação animal.

Um dos objetivos deste trabalho passa pela identificação de espécies emergentes de *Brucella* em soros humanos. Os soros selecionados pertencem a indivíduos com suspeita de infeção para *Brucella* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Leptospira* sp., cujo seu diagnóstico teve um resultado negativo. Numa primeira abordagem, foi realizado o teste de aglutinação Rosa de Bengala em 168 soros selecionados, dos quais, apenas cinco apresentaram um resultado positivo para o teste de aglutinação, com o aro típico para a presença de *Brucella* spp. Esta baixa taxa de resultados positivos pode ter ocorrido uma vez que a resposta imunitária desenvolvida pelo humano em infeções causadas por espécies lisas de *Brucella* é dominada pela produção de anticorpos para o S-LPS. Esta resposta segue o padrão clássico, com aumento dos níveis de IgM na primeira semana, seguido pela produção de IgG1 na segunda semana e, mais tarde, por pequenas quantidades de IgG2 e IgA ¹²¹. Mas em casos prolongados de doença, a concentração de IgM diminui,

e sendo este um dos anticorpos detetados pelo teste de aglutinação Rosa de Bengala, esta situação pode levar a resultados falsos negativos. Outra explicação que pode justificar estes resultados corresponde ao facto de este ensaio poder fornecer resultados num espaço de 4 min, no entanto os soros com títulos relativamente altos de anticorpos não aglutinantes podem necessitar de até 8 min para que seja possível a observação do aro típico de um resultado positivo para *Brucella* spp.¹²². Contudo, é importante realçar que os soros utilizados pertencem a doentes sem suspeita de brucelose, mas foram incluídos neste estudo devido à falta de diagnóstico e pela semelhança da sintomatologia originada pelas diferentes bactérias.

Relativamente às amostras positivas para *Brucella* com o teste Rosa de Bengala, há que notar que existe uma vasta gama de espécies que podem causar uma reação cruzada na pesquisa de anticorpos, uma vez que a molécula LPS transporta epítomos que se cruzam com uma variedade de organismos Gram-negativos, incluindo *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella enterica* serovar Urbana O:30, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 e O157, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia*, e *Afipia clevelandensis*^{20,121}.

Foi então realizado um ensaio de RT-PCR nas cinco amostras positivas para o teste de aglutinação Rosa de Bengala, e para 27 amostras de soros selecionados de forma aleatória, a partir da amostragem inicial. Assim, extraiu-se DNA de um total de 32 amostras de soro. Após a realização do RT-PCR, apenas 21 amostras apresentaram um resultado positivo para *Brucella* spp., embora com curvas de amplificação tardias. Estas amostras foram enviadas para sequenciação, e nenhuma das amostras testadas apresentou resultados que pudessem identificar sequências específicas do genoma de *Brucella* spp. (elemento de inserção múltipla IS711), uma vez que não foi possível determinar quais os nucleótidos incorporados nessa sequência.

Foi igualmente realizado um ensaio de RT-PCR em 27 amostras de soros humanos com um resultado positivo para *Brucella* spp. em ensaios imunológicos realizados no Laboratório de Imunologia do DDI no INSA. Contudo, o resultado de todas as amostras em estudo verificou-se negativo para a deteção de *Brucella* spp. O desempenho do RT-PCR pode ser influenciado por diversos fatores internos e externos, tais como a utilização de diferentes protocolos de extração, a *master mix* utilizada no PCR, os parâmetros de amplificação, a presença de inibidores, o tipo de amostra clínica (soro, plasma, etc.) e os genes alvo utilizados^{72,123-126}. Apesar de vários estudos demonstrarem que o soro é uma boa amostra clínica para a deteção de brucelose^{124,127}, este possui constituintes como proteínas e imunoglobulinas G, que são conhecidas como inibidores¹²⁸⁻¹³⁰. Outro fator bastante relevante reside na presença de ácidos nucleicos no soro quando se trata de infeções localizadas, como muitas vezes acontece com as espécies de *Brucella*. Um paciente pode apresentar anticorpos para uma determinada doença, mas pode não ser possível encontrar o microrganismo em circulação no sangue, e uma vez que o *threshold* para a carga bacteriana de *Brucella* é bastante baixo, pode não ser possível detetar esta bactéria em circulação¹³¹.

As bactérias do género *Brucella* têm natureza intracelular facultativa, e a contagem bacteriana pode ser baixa no corpo de um doente¹³² e, assim, a presença de inibidores, tanto no soro como em amostras de sangue total, podem reduzir a sensibilidade dos *primers* utilizados no diagnóstico por métodos moleculares^{129,130,133}. Também foi descrito que a baixa sensibilidade encontrada nestas técnicas moleculares pode ser parcialmente explicada por uma preservação inadequada das amostras de soro (mais de três meses a -20 °C), antes da realização de RT-PCR. Assim sendo, pode esperar-se uma sensibilidade mais elevada em amostras colhidas recentemente¹³⁴. Por último, e com uma importância também muito relevante, temos o método de extração de DNA, que pode afetar substancialmente a quantidade, pureza e integridade do DNA obtido e, em consequência, afetar a sensibilidade dos métodos

moleculares. Esta situação é particularmente relevante para o diagnóstico de brucelose, visto que existe apenas uma pequena quantidade de DNA alvo na amostra clínica ¹³⁵.

Para o ensaio de RT-PCR foi utilizado como alvo de amplificação o elemento de inserção IS711, que se encontra exclusivamente presente no genoma de todas as espécies descritas do género *Brucella*. Das 21 amostras sequenciadas para a pesquisa deste elemento de inserção, nenhuma confirmou a sua presença. Em 2011, Mancilla e a sua equipa ¹³⁶ relataram a mobilidade do elemento de inserção IS711 em estirpes de *B. abortus* sob condições naturais, causando polimorfismo dentro das estirpes desta espécie. Este estudo descreve várias estirpes de *B. abortus* isoladas a partir de gado, que transportam sete cópias de IS711, em vez de seis, sendo esta nova cópia encontrada num *locus* completamente diferente do previamente reportado. A razão para a presença desta cópia sugere uma transposição replicativa dentro do genoma, deste elemento de inserção ¹³⁶. Contudo, noutro estudo foi encontrada uma nova inserção de IS711 dentro do gene *Omp31*, num isolado atípico de *B. ovis*, recuperado de um carneiro infetado na Hungria, que não foi corretamente identificado no ensaio de PCR ¹³⁷. Com base nestes casos, o facto de o elemento de inserção IS711 poder ser um elemento de transposição na espécie de *Brucella*, a sua fiabilidade na diferenciação do género fica enfraquecida, uma vez que foi demonstrado polimorfismo dentro das estirpes de uma determinada espécie. Também a variação da sequência de IS711 entre espécies, e até mesmo a sua ausência em algumas estirpes, coloca em causa a sua utilização como alvo de amplificação ¹³⁸. Com isto, a aplicação a nível do diagnóstico de IS711 revela a necessidade de uma abordagem mais aperfeiçoada para a determinação de polimorfismos entre as espécies de *Brucella*, mais única e fiável mesmo a nível do biovar, se possível ¹³⁹.

A ocorrência de falsos positivos no ensaio de RT-PCR pode ser explicada pela utilização do corante SYBR Green I. Este método permite a deteção específica e não específica de produtos amplificados, através do corante de ligação à dupla cadeia de DNA (*double stranded DNA*; dsDNA). O SYBR Green I, quando se liga à região *minor groove* da dsDNA, emite fluorescência 1 000 vezes mais do que estando livre em solução ¹⁴⁰. Portanto, a quantidade crescente de dsDNA presente no tubo de reação leva a uma maior quantidade de corante ligado e, em consequência, ao aumento do sinal fluorescente do SYBR Green I. Este é um método relativamente rentável e fácil de usar, porém, a sua especificidade é a maior preocupação, uma vez que ocorrem produtos não específicos, que são refletidos na curva de dissociação do produto amplificado como picos inespecíficos ¹⁴¹. Ou seja, qualquer produto não específico, como dímeros de *primers*, pode produzir resultados falsos positivos, levando a dados incorretos e diminuição do desempenho ¹⁴²⁻¹⁴⁶.

Conclusão e Perspetivas Futuras

Os casos reportados de espécies de *Brucella* emergentes, bem como o aparecimento das espécies clássicas em reservatórios atípicos, vêm expor uma necessidade intrínseca da otimização e desenvolvimento de novos métodos de tipagem e caracterização dos microrganismos pertencentes a este género. No largo espectro de métodos de diagnóstico que existem para a brucelose humana e animal, todos apresentam as suas limitações.

Os testes serológicos, além de rápidos e sensíveis a nível de diagnóstico, podem levar a resultados falsos negativos em casos mais prolongados da doença. Igualmente, a existência de uma vasta gama de microrganismos Gram-negativos que podem causar reações cruzadas na pesquisa de anticorpos, fazem com que os resultados provenientes deste teste de diagnóstico tenham que ser confirmados com outras técnicas. Este trabalho evidencia as dificuldades associadas à deteção de *Brucella* spp. e, mesmo a nível da deteção com técnicas moleculares, estas apresentam as suas limitações, como é o caso do SYBR Green I, que por amplificar produtos específicos e não específicos, pode levar a resultados falsos positivos, como foi observado. Assim, é necessária a otimização e desenvolvimento de novos métodos de caracterização e tipagem deste género. A utilização de *primers* e sondas na reação de RT-PCR pode originar vantagens, na medida em que a especificidade das técnicas que fazem uso desta metodologia é mais elevada, uma vez que apenas amplificam produtos específicos. O modo de conservação das amostras de soro também deve ser tido em conta, uma vez que pode diminuir a eficácia do RT-PCR. Uma divulgação sobre a importância desta doença e a probabilidade de casos não diagnosticados deve ser realizada, tanto a nível da saúde humana como animal.

Contudo, esta Dissertação de Mestrado encontra-se inserida num projeto que envolve várias instituições, em que as dificuldades encontradas no presente trabalho poderão auxiliar projetos futuros, de modo a ser desenvolvida uma rede de vigilância mais ativa e eficaz de diagnóstico da brucelose.

III. *Multiple Locus Variable number tandem repeats Analysis*

Contextualização Teórica

A brucelose é uma das zoonoses bacterianas mais comuns, com um grande impacto tanto na indústria agrícola como na saúde pública ¹⁴⁷. Este impacto, especificamente nos países pouco desenvolvidos, levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a classificar esta doença como uma das principais zoonoses negligenciadas no mundo, e dada a ausência de sinais e sintomas específicos, a brucelose é, de um modo geral, uma doença sub-diagnosticada ¹⁴⁸. Estudos que envolvem hibridização DNA-DNA e genómica comparativa revelam que as espécies de *Brucella* são caracterizadas por mais de 80% de homologia interespecies e mais de 98% de semelhança a nível das suas sequências ^{112,149}, onde a sequência do rRNA 16S demonstra uma identidade muito próxima de 100% entre todas as espécies de *Brucella* spp. O género abrange, atualmente, 12 espécies geneticamente relacionadas, podendo a brucelose humana ser originada por várias destas espécies. Contudo, a espécie *B. melitensis* é a mais virulenta e o principal agente de infeção humana ^{13,150}. Deste modo, a identificação das espécies de *Brucella* em circulação é muito importante, principalmente para que seja possível o rastreio das principais fontes de infeção e a monitorização das vias de transmissão ¹⁵¹. A identificação das espécies do género *Brucella* através de ensaios de PCR é suficiente para o diagnóstico de doenças humanas e animais, ou até para a deteção de contaminação alimentar, mas é de facto um ensaio insuficiente para o rastreio de surtos ou eventos de bioterrorismo ⁹⁹.

Para atingir o objetivo da discriminação a nível da sub-espécie, têm sido desenvolvidos por vários grupos de investigação desde 2003, diversos estudos de MLVA ^{51,111,112}. Este esquema de tipagem de *Brucella* através de análises de MLVA provou ter capacidade de diferenciar espécies de *Brucella*, biovars e até alguns isolados. Este estudo é facilitado pela criação de uma base de dados *online* de perfis de MLVA-16, que se encontra disponível para todos os laboratórios, permitindo a comparação de estirpes de *Brucella* a nível mundial ^{51,152}. A determinação *in silico* dos esquemas de MLVA pode ser de extrema utilidade, uma vez que supera o processo laborioso da avaliação de MLVA baseada em PCR, permitindo também a comparação cruzada dos dados genéticos, que foram determinados na última década. Deste modo, foi desenvolvido um *Python script*, que se foca na determinação *in silico* dos esquemas de MLVA de *Brucella*, tirando partido do número crescente de genomas sequenciados ¹⁵⁰. Uma vez que não foi efetuada qualquer validação experimental deste *script*, este trabalho pretende avaliar a concordância entre os perfis de MLVA obtidos tanto através de abordagens baseadas em PCR (MLVA_Lab) como através de abordagens WGS (MLVA_WGS), para várias espécies de *Brucella*, com o objetivo de verificar a validade desta transição tecnológica, subjacente à caracterização genética de *Brucella*.

Materiais E Métodos

1. Estirpes bacterianas

O material biológico utilizado no procedimento experimental consistiu num conjunto de estirpes pertencentes ao biobanco do INSA, DDI, da Unidade de Resposta a Emergência e Biopreparação (**Tabela S4**). A estirpe *B. melitensis* 16M (NC_003317 e NC_003318) foi usada como referência. Todas as amostras foram manipuladas num laboratório de biossegurança de Nível 3 (BSL-3). As estirpes de *Brucella* spp. foram semeadas em meio COL (*Columbia Blood Agar* suplementado com 5% de sangue de cavalo, a 37 °C durante 48 h) e o DNA total foi extraído das culturas frescas na plataforma *NucliSens easyMAG* (*Biomerieux*), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as estirpes foram identificadas como espécies de *Brucella* através de RT-PCR, de acordo com o protocolo previamente descrito e publicado ¹²⁰.

2. MLVA-16 (MLVA_Lab)

O ensaio MLVA-16 foi realizado como descrito por Le Fleche *et al.* ⁵¹, com modificações descritas por Garofolo *et al.* ¹¹³. Os 16 pares de *primers* utilizados (**Tabela III.1**) foram divididos em três painéis: painel 1 com oito *loci* (Bru06, Bru8, Bru11, Bru12, Bru42, Bru43, Bru45 e Bru55), painel 2A com três *loci* (Bru18, Bru19 e Bru21) e painel 2B com cinco *loci* (Bru04, Bru07, Bru09, Bru16 e Bru30) ¹¹³.

O PCR foi realizado em quatro reações multiplex, num volume final de 10 µL, e as reações continham 1x *Type-it Multiplex PCR Master Mix* (*Qiagen*), 0,5x solução *buffer*, os *primers* em concentrações apropriadas e 5 µL de DNA total das estirpes. A amplificação foi realizada num termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) nas seguintes condições: 96 °C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos (para Multiplex 1, 3 e 4) ou 24 ciclos (para Multiplex 2) de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 90 s e 72 °C durante 30 s, seguidos de 60 °C durante 30 min. O Multiplex 2 foi executado durante 24 ciclos para conter os artefactos de amplificação VNTR ¹¹³.

Tabela III.1 - Primers utilizados em cada uma das reações Multiplex. (Adaptado de Garofolo *et al.* 2013).

	<i>Locus</i>	Sequência dos <i>Primers</i> (5' → 3')	Gama do tamanho dos alelos (pb)
Multiplex 1	Bru30	F: PET-TGACCGCAAACCATATCCTTC R: TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG	119 - 199
	Bru08	F: PET-ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC R: ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	312 - 384
	Bru11	F: 6FAM-CTGTTGATCTGACCTTGCAACC R: CCAGACAACAACCTACGTCCTG	257 - 1076
	Bru45	F: 6FAM-ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG R: CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	133 - 187
	Bru19	F: NED-GACGACCCGGACCATGTCT R: ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	79 - 205
Multiplex 2	Bru06	F: NED-GATTGCGGAACGTCTGAACT R: TAACCGCCTTCCACATAATCG	312 - 714
	Bru42	F: VIC-CATCGCCTCAACTATACCGTCA R: ACCGCAAATTTACGCATCG	164 - 914
Multiplex 3	Bru12	F: NED-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA R: GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	302 - 452
	Bru18	F: PET-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT R: GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	130 - 186
	Bru55	F: PET-TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT R: AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT	193 - 553
	Bru21	F: 6FAM-CTCATGCGCAACCAAAACA R: GTGGATACGCTCATTCTCGTTG	431 - 463
	Bru04	F: VIC-CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG R: TGGTTTTTCGCCAATATCAACAA	313 - 473
Multiplex 4	Bru07	F: NED-GCTGACGGGGAAGAACATCTAT R: ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA	134 - 246
	Bru09	F: VIC-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC R: GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	124 - 292
	Bru43	F: 6FAM-TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT R: TATTTCCGCTGCCATAAAC	170 - 194
	Bru16	F: 6FAM-ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT R: GGCCATATCCTTCCGCAATA	227 - 353

F - forward; R - reverse; pb - pares de bases.

A análise dos fragmentos foi realizada no Departamento de Genética Humana, pela Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA. A cada 1,1 µL de produto de PCR foram adicionados 15 µL de corante *GeneScan 500 LIZ* ou *GeneScan 1200 LIZ* (*Applied Biosystems*), dependendo do tamanho esperado dos fragmentos, e as soluções foram desnaturadas a 96 °C durante 3 ou 5 min, respectivamente. Foi realizada a eletroforese das misturas num 3500 *Genetic Analyzer* de oito capilares, equipado com capilares de 50 cm de comprimento e polímero POP7 (*Applied Biosystems*). A estimativa dos tamanhos moleculares dos produtos de PCR foi obtida através do software *GeneMapper 6* (*Applied Biosystems*), com parâmetros de análise padrão. A estirpe de referência *B. melitensis* 16M, para a qual o tamanho é esperado e conhecido para cada *locus* VNTR, foi utilizada como controle.

3. Whole Genome Sequencing (WGS)

Foi realizado WGS para cada estirpe, como descrito anteriormente por Pinto *et al.* ¹⁵³, na Unidade de Bioinformática, do DDI no INSA. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA purificado foi realizada através da utilização do *DNA HS Assay Kit* (*Thermo Fischer Scientific*), num fluórometro *Qubit* e através de eletroforese em gel de agarose (0,8%), respetivamente. Foram então utilizadas amostras de DNA de alta qualidade para preparar bibliotecas de indexação dupla *Nextera XT Illumina*, que foram sujeitas a geração de *clusters* e sequenciação *paired-end* numa plataforma *MiSeq Illumina* (*Illumina Inc.*), de acordo com as instruções do fabricante.

O controlo de qualidade da leitura e a montagem bacteriana *de novo* foram realizados através do *INNUca* v4.0.1 *pipeline* (<https://github.com/B-UMMI/INNUca>), que consiste em vários módulos integrados para a leitura QA/QC, montagem *de novo* e passos de otimização pós-montagem. Após a análise de qualidade das leituras (*FastQC* v0.11.5 - <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e após a limpeza (*Trimmomatic* v0.36) ¹⁵⁴, os genomas foram montados através de *SPAdes* 3.11 ¹⁵⁵ e subsequentemente melhorados utilizando *Pilon* v1.18 ¹⁵⁶. Com o objetivo de avaliar o impacto do “*polishing* pós-montagem” sobre os genomas e, do mesmo modo, sobre as análises de MLVA *in silico*, a montagem através de *SPAdes* foi também realizada na ausência da etapa *Pilon*. Tendo em consideração que a extração dos *loci in silico* pode ser influenciada pela qualidade dos genomas montados, foi aplicada outra montagem *de novo*, a *VelvetOptimiser* v.2.2.5 ¹⁵⁷ (<https://github.com/tseemann/VelvetOptimiser>), para fins comparativos.

4. MLVA baseado em WGS (MLVA_WGS)

Os genomas bacterianos foram submetidos a um *script Python* (<https://github.com/dinergate42/in-silico-typing>) para uma extração *in silico* do esquema MLVA-16 de *Brucella* (16 *loci*), como previamente descrito ¹⁵⁰. O *script* utilizado baseia-se na contagem de segmentos repetitivos de DNA, contidos em “caixas” de DNA conservadas, que se situam a montante e a jusante das repetições. Como a determinação do número de segmentos repetidos a partir de dados WGS pode ser suscetível a erro, foi verificado de forma cuidadosa cada *locus*, tendo em conta o comprimento total esperado, a homogeneidade da repetição interna e a probabilidade de se obterem VNTRs que colapsaram durante a montagem. Esta verificação foi realizada com recurso a uma tabela previamente publicada por Le Flèche *et al.* ⁵¹, e com modificações por Garafolo *et al.* ¹¹³ (**Tabela S5**). Todos os genótipos de MLVA-16 resultantes foram comparados com uma base de dados pública, com 2 215 entradas de estirpes da espécie *B. melitensis*, que podem ser avaliadas *online* (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/>) ¹⁵⁸. Sempre que houver referência à abordagem de MLVA_WGS é em relação à abordagem que utilizou *SPAdes* com *Pilon*.

5. Avaliação da concordância MLVA_WGS versus MLVA_Lab

Para verificar o desempenho da abordagem MLVA_WGS, foi determinada a percentagem de concordância entre os métodos de MLVA_Lab e MLVA_WGS, através do cálculo do número de resultados idênticos, divididos pelo número total de *hits* que foram detetados em simultâneo por ambas as abordagens. Embora a abordagem MLVA_Lab seja considerada a técnica *gold standard* (com um aumento da precisão após a otimização do PCR multiplex com corantes fluorescentes para eletroforese capilar), foi determinado que a utilização do número total de *hits* que foram detetados simultaneamente por ambas as abordagens, como denominador, é o procedimento mais razoável. Embora alguns *hits*

tenham sido exclusivamente detetados pela abordagem MLVA_Lab, o cenário contrário também foi observado. O número de *hits* possíveis é de 1 328 (ou seja, 83 estirpes x 16 *loci*).

Finalmente, para todas as estirpes, o desempenho do *script* bioinformático na extração de todos os *loci* do MLVA foi avaliado tendo em conta a qualidade do genoma gerado pelas duas montagens (*SPAdes* e *VelvetOptimiser*). Para cada condição, tanto a profundidade média de cobertura, como o número de *contigs* de cada genoma, foram relacionados com o número de alelos extraídos. Foi calculado o coeficiente de *Pearson* (*r*) para observar potenciais associações lineares. Todo este procedimento foi realizado na Unidade de Bioinformática, do DDI no INSA.

Resultados

O desempenho da abordagem MLVA_WGS foi avaliado através da determinação da porcentagem de concordância com os resultados obtidos pela abordagem padrão MLVA_Lab. Para facilitar a compreensão, foi definido como “*shared hits*” aqueles que foram simultaneamente detetados por ambas as abordagens, independentemente da sua correta atribuição de alelos. Neste sentido, o número de “alelos correspondentes” foi estimado através da utilização do número de “*shared hits*” como denominador.

De um modo geral, a abordagem MLVA_WGS detetou 1 265 *hits*, de um total de 1 328 *hits* possíveis (95,3%). Um, dois e mais de três *loci* não apresentaram resultados para 18 (21,6%), sete (8,4%), e sete (8,4%) estirpes, respetivamente (**Figura III.1**). Em relação à abordagem MLVA_Lab, foram detetados 1 269 *hits*, onde um, dois e mais de três *loci* não apresentaram resultados para 18 (21,6%), oito (9,6%) e seis (7,2%) estirpes, respetivamente (**Figura III.1**).

Os perfis alélicos obtidos por ambas as abordagens estão apresentados na **Tabela S6**. De um total de 1 328 *hits*, 1 222 (92,0%) foram detetados em simultâneo por ambas as abordagens (“*shared hits*”), onde 6,8% foram detetados apenas por uma das abordagens. As discrepâncias são observadas com mais incidência para os *loci* Bru07 e Bru09 (ambos pertencentes ao painel 2B do perfil de MLVA-16) e para o *locus* Bru11 (pertencente ao painel 1) (**Figura III.2**). Tanto a abordagem MLVA_WGS como a abordagem MLVA_Lab falharam na deteção de 16 *hits* dos 1 328 possíveis (1,2%), onde 12 recaem no painel 2, com maior foco nos *loci* Bru04 e Bru07.

A análise *per locus* determinada pelas abordagens MLVA_WGS e MLVA_Lab mostrou uma taxa de concordância dos perfis de MLVA (rácio de “alelos correspondentes” pelo número de “*shared hits*”) que varia entre 89,9% e 100% (**Figura III.2**). As discrepâncias observadas envolveram *loci* pertencentes aos três painéis do perfil de MLVA-16, sendo mais evidentes em seis *loci* (Bru06, Bru12, Bru55, Bru19, Bru21 e Bru04). De um modo geral, a média de concordância dos perfis MLVA para todos os 16 *loci* foi de 96,4%, o que revela uma elevada concordância de alelos entre as duas abordagens em estudo.

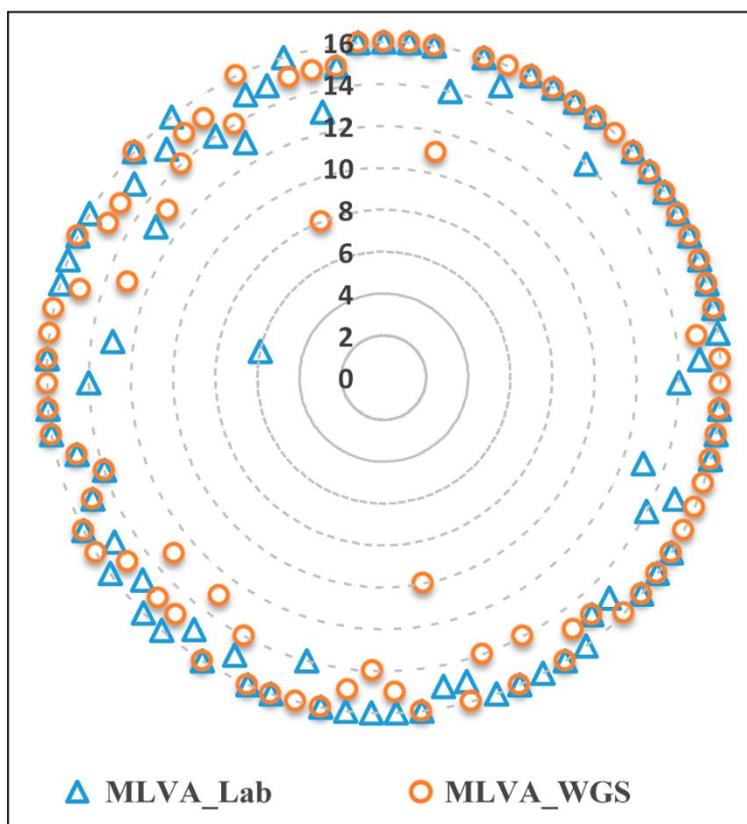


Figura III.1 - Número de loci MLVA detetados por estirpe através das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS. A informação de cada abordagem está disposta através de um raio imaginário no círculo do gráfico (um raio por estirpe). Os resultados da abordagem MLVA_WGS são relativos à extração dos loci MLVA em que os genomas foram montados com SPAdes 3.11, melhorado com Pilon v1.18 (ver métodos para detalhes). (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

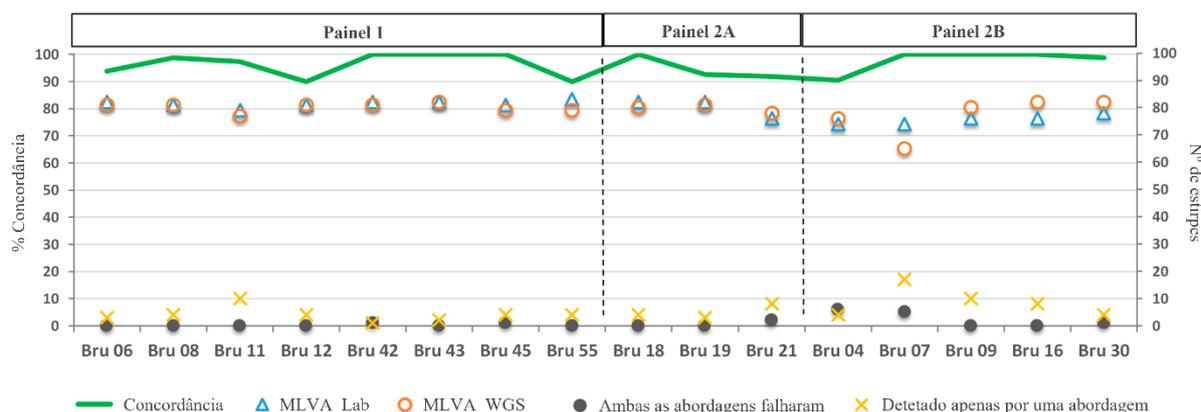
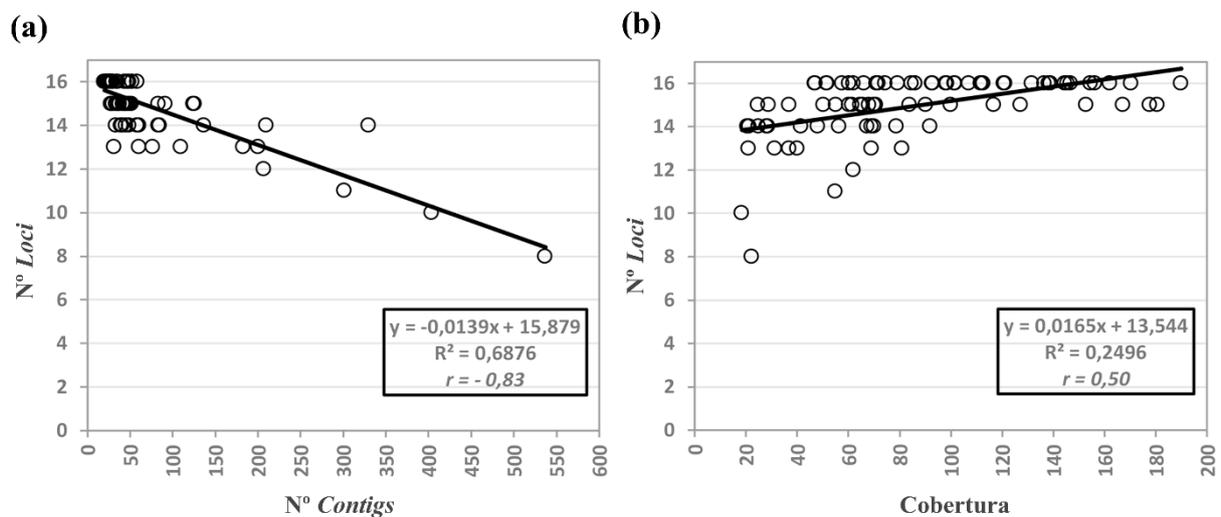


Figura III.2 - Desempenho das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS per locus. O gráfico superior representa o número de estirpes para as quais foi possível determinar um alelo *per locus*, bem como o número de estirpes que partilham alelos idênticos entre as duas metodologias. O gráfico inferior mostra a percentagem de concordância *per locus* entre ambas as abordagens. Para ambos os gráficos, os loci encontram-se agrupados de acordo com o painel MLVA-16 ao qual pertencem (ou seja, Painel 1, Painel 2A e Painel 2B). Os resultados da abordagem MLVA_WGS são relativos à extração dos loci MLVA em que os genomas foram montados com SPAdes 3.11, melhorado com Pilon v1.18 (ver métodos para detalhes). (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

Uma vez que o *script Python* para a extração *in silico* dos esquemas de MLVA para *Brucella* spp. é aplicado após a montagem do genoma, podendo estar dependente da qualidade das “reads”, foi avaliada a qualidade das sequências geradas como *input*. A influência da profundidade média de cobertura e do número de *contigs* na eficácia do *script* bioinformático está ilustrada na **Figura III.3**. Como esperado, observou-se uma correlação linear negativa entre a eficácia da extração *in silico* e o número de *contigs* montados, com genomas menos fragmentados, o que permitiu a deteção de um maior número de alelos. Por outro lado, uma maior profundidade média de cobertura do genoma parece favorecer a extração *in silico* dos *loci* do perfil de MLVA.

Como avaliação final, o desempenho do *script* bioinformático foi também avaliado através da utilização de sequências genómicas montadas com diferentes técnicas como *input* (*SPAdes* versus *VelvetOptimiser*) (**Figura S1**). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas relativamente ao número de *loci* extraídos tanto na presença, como na ausência de “*polishing pós-montagem*” (dados não mostrados), foi possível observar que a montagem realizada por *VelvetOptimiser* foi particularmente afetado por uma baixa profundidade de cobertura e fragmentação do genoma. De facto, para uma profundidade média de cobertura menor que 50, bem como para genomas fragmentados elevados, o número de *loci* do perfil de MLVA detetados diminuiu de forma mais acentuada aquando da utilização da técnica de montagem *VelvetOptimiser*, quando comparado com a técnica de montagem com recurso a *SPAdes*.



Discussão

O controlo da brucelose requer uma vigilância cuidadosa e precisa, bem como a utilização de métodos altamente discriminatórios para a caracterização de estirpes de surtos, e para a determinação da fonte de infeção e vias de transmissão. Durante muitos anos, os métodos de tipagem múltipla foram utilizados para a caracterização de *Brucella* tanto a nível da espécie como a nível do biovar. Estes métodos dependem da especificidade do hospedeiro, das características de crescimento, de reações bioquímicas, serotipagem e tipagem bacteriofágica, mas com falta de poder discriminatório¹⁵⁹. Alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos focam-se na aplicação de abordagens baseadas em WGS para *Brucella* spp., onde estirpes de múltiplas espécies e localizações distintas são, normalmente, incluídas^{151,160-162}. No entanto, atualmente a técnica de MLVA baseada em PCR é a abordagem mais utilizada para a investigação de surtos, sendo considerada a técnica *gold standard* para a tipagem de *Brucella*. Embora o ensaio tradicional se baseie num PCR singleplex, seguido de eletroforese em gel de agarose, alguns laboratórios já adotaram uma abordagem menos suscetível a erros, baseada num PCR multiplex e eletroforese capilar multicolor^{113,163}. Os 16 marcadores envolvidos no esquema de MLVA-16 são uma combinação de *loci* moderadamente variáveis (minissatélites, painel 1) e altamente discriminatórios (microsatélites, painel 2A e painel 2B)¹⁶⁴. Um ensaio de tipagem através de MLVA depende da seleção de marcadores, que individualmente não iriam fornecer um *clustering* relevante. Utilizados em separado, os marcadores *Tandem Repeat* podem não ser suficientemente informativos, ser demasiado variáveis, ou ainda podem apresentar um elevado nível de homoplasia. Como tal, a combinação de *loci* independentes e bem selecionados pode ser altamente discriminatória, como foi anteriormente demonstrado para outras espécies⁵¹. Este ensaio pode ser utilizado como uma importante ferramenta epidemiológica no controlo de surtos e prevenção da brucelose¹⁶⁵, bem como no estudo da diversidade genética entre diferentes espécies de *Brucella* num contexto evolutivo⁴⁹.

Em nome da transição inevitável da tipagem clássica para as abordagens baseadas em WGS, foram recentemente desenvolvidos *scripts Python* para a extração rápida *in silico* dos alelos pertencentes ao painel de MLVA de *Brucella*^{150,163}. Esta questão irá permitir a atribuição das técnicas com recurso a MLVA na era genómica, evitando-se a perda indesejável de informação genética, que tem sido fornecida durante mais de uma década através da tipagem de MLVA baseada em PCR (técnica *gold standard*). Esta situação é de extrema importância, uma vez que os prazos da transição tecnológica irão variar de forma considerável entre os diferentes países. Como até agora não tinha sido realizada qualquer

avaliação experimental para nenhum desses *scripts*¹⁵⁰, o principal objetivo deste trabalho é aceder ao seu desempenho, em relação ao método baseado em PCR.

De um modo geral, a abordagem MLVA_WGS detetou 95,3% de todos os 1 328 hits possíveis, e a concordância com o método experimental para a deteção dos alelos corretos foi de 96,4%. Apesar do elevado nível de concordância encontrado, alguns *loci* não foram detetados por nenhuma das abordagens, ou apenas foram detetados por uma das abordagens. Embora a deteção da maioria dos *loci* não tenha falhado simultaneamente em várias estirpes, devemos destacar os *loci* Bru04 e Bru07 (ambos pertencentes ao painel 2B), para os quais a abordagem MLVA_Lab falhou em nove das 83 estirpes em estudo. Pode colocar-se a hipótese da ocorrência de dificuldades experimentais associadas a uma reação de PCR pouco otimizada para estes *loci* específicos. Contudo, observou-se que Bru04 e Bru07 foram os *loci* para os quais a abordagem MLVA_WGS falhou mais (para sete e 18 estirpes, respetivamente). Esta situação pode ser explicada pelo facto de estes *loci* estarem entre os que possuem segmentos de sequências repetitivas mais curtos, e isto pode, hipoteticamente, apresentar um obstáculo para uma distinção experimental mais precisa entre o número de repetições. De um ponto de vista bioinformático, segmentos repetitivos curtos podem, eventualmente, ter impacto na determinação de *loci* de MLVA, principalmente quando ocorre uma elevada fragmentação do genoma¹⁶⁶.

De acordo com os resultados obtidos para o presente conjunto de dados, é possível observar que o desempenho da abordagem MLVA_WGS não parece depender do *polishing* pós-montagem, mas depende, de forma clara, da profundidade de cobertura e do grau de fragmentação da montagem (onde a utilização de *SPAdes* tem um melhor desempenho). Ainda assim, uma profundidade mínima de cobertura de aproximadamente 50x e um número máximo de aproximadamente 200 *contigs* (um intervalo em que ambas as abordagens de montagem se comportam de forma semelhante) parece constituir “limites” de orientação para a futura aplicação do *script*. É de notar que algumas falhas subjacentes à abordagem MLVA_WGS podem, em teoria, ser resolvidas pela utilização de uma tecnologia de leitura prolongada, uma vez que possibilitam ultrapassar os problemas de montagem associados a sequências repetidas, embora esta tecnologia seja mais propensa a produzir erros de sequenciação. Por outro lado, a utilização de leituras muito curtas (por exemplo, 100 nucleótidos (nt)) pode produzir genomas altamente fragmentados e, em consequência, produzir uma determinação errada do número de repetição. Neste estudo, utilizou-se a tecnologia *Illumina*, com leituras de 250-300 nt, o que em conjunto com uma profundidade mínima de cobertura de aproximadamente 50x produziu resultados altamente sólidos¹⁶⁶.

Conclusão e Perspetivas Futuras

A determinação *in silico* dos esquemas de MLVA permite ultrapassar a laboriosa avaliação do MLVA_Lab, e permite a comparação cruzada com os dados genéticos associados à tipagem de *Brucella* spp. na última década. Apesar dos resultados sólidos deste trabalho, é essencial a otimização dos processos de extração, de modo a ser possível a amplificação dos *loci* em falta, em ambas as abordagens. O aumento do conhecimento do genoma de *Brucella* e a procura de polimorfismos é de extrema importância, não só em estudos filogenéticos e epidemiológicos, mas também para clarificar as diferenças que existem a nível fenotípico, de virulência e de preferência de hospedeiro, que são observadas entre as espécies de *Brucella*.

Em conclusão, embora este estudo tenha focado as espécies mais prevalentes de *Brucella* (com ênfase em *B. melitensis*), o *script* avaliado parece ser uma ferramenta útil e robusta para a extração *in silico* de perfis de MLVA de estirpes de *Brucella*, permitindo lidar com um grande número de amostras num curto período de tempo, e possibilita a ocorrência de estudos moleculares epidemiológicos. Esta abordagem permite uma transição contínua e não disruptiva para uma nova era de tipagem, que coloca as novas estirpes sequenciadas no quadro da caracterização genética obtida para milhares de isolados, recolhidos em todo o mundo ao longo da última década. Isto será certamente importante para os laboratórios de referência de saúde pública, para que seja mantida uma vigilância epidemiológica ativa da brucelose.

Os dados sintetizados nesta Dissertação sugerem que, para identificar, reduzir ou erradicar a brucelose, uma abordagem *Global One Health* é essencial. O conceito *One Health* pressupõe que tanto a saúde humana, animal e ambiental se encontram intimamente interligadas, e que a melhoria numa dessas áreas depende da interdependência das três. Assim, a colaboração entre profissionais de várias áreas e setores é fundamental para se chegar a soluções que levem à mitigação de doenças infecciosas, como é o caso da brucelose. No futuro, e para implementar a abordagem *One Health*, pretende-se fortalecer as colaborações com o Laboratório Nacional de Referência Veterinária e a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, a fim de expandir a aplicabilidade destas abordagens de WGS como uma ferramenta que irá identificar melhor os surtos de brucelose, as fontes infecciosas e interromper as cadeias de transmissão.

Referências Bibliográficas

1. Moreno, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology* vol. 5 (2014).
2. Mantur, B., Amarnath, S. & Shinde, R. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* vol. 25 188–202 (2007).
3. De Ley, J., Mannheim, W. & Segers, P. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 35–42 (1987).
4. Godfroid, J. *et al.* A ‘One Health’ surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 241–248 (2013).
5. Tonna, I. & Tonna, A. Brucellosis. *The New England journal of medicine* vol. 353 1071–1072 (2005).
6. Wyatt, H. V. Lessons from the history of brucellosis. *OIE Rev. Sci. Tech.* **32**, 17–25 (2013).
7. Araj, G. F. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**, S12–S17 (2010).
8. O’Callaghan, D. Human brucellosis: Recent advances and future challenges. *Infect. Dis. Poverty* **9**, 9–10 (2020).
9. Baykam, N. *et al.* In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int. J. Antimicrob. Agents* **23**, 405–407 (2004).
10. Whatmore, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 9 1168–1184 (2009).
11. Al, S. *et al.* Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. **69**, 137–145 (2007).
12. Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2229–2236 (2006).
13. Tigertt, W. D. *Principles and Practice of Infectious Diseases. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 35 (1986).
14. Franz, D. R. *et al.* Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *J. Am. Med. Assoc.* **278**, 399–411 (1997).
15. Jacobs, M. K. The history of biologic warfare and bioterrorism. *Dermatologic Clinics* vol. 22 231–246 (2004).
16. Tzaneva, V., Ivanova, S., Georgieva, M. & Tasheva, E. Investigation of the spread of brucellosis among human and animal populations in southeastern Bulgaria, 2007. *Euro Surveill.* **14**, 19187 (2009).
17. Corbel, M. J. Brucellosis in humans and animals. *WHO Libr. Cat. Publ. Data* 1–88 (2006).
18. Zhong, Z. *et al.* Parallel gene loss and acquisition among strains of different *Brucella* species and biovars. *J. Microbiol.* **50**, 567–574 (2012).
19. Atluri, V. L., Xavier, M. N., De Jong, M. F., Den Hartigh, A. B. & Tsolis, R. M. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 523–541

- (2011).
20. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. & Tsianos, E. Medical progress Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2325–2326 (2005).
 21. Seleem, M. N., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 392–398 (2010).
 22. Bohlin, J. *et al.* Genomic comparisons of *Brucella* spp. and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods. *BMC Evol. Biol.* **10**, 249 (2010).
 23. Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* **5**, 1–11 (2006).
 24. Banai, M. & Corbel, M. Taxonomy of *Brucella*. *Open Vet. Sci. J.* **4**, 85–101 (2014).
 25. De Tejada, G. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.* **63**, 3054–3061 (1995).
 26. Cloeckert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A. & Elzer, P. H. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: Past, present and future. *Vet. Microbiol.* **90**, 229–247 (2002).
 27. Pessegueiro, P., Barata, C. & Correia, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. *Med. Interna (Bucur)*. **10**, 91–100 (2003).
 28. Verger, J.M.; Grimont, F.; Grimont, P.A.D.; Grayon, M. . *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**:292-295 (1985).
 29. Wattam, A. R. *et al.* Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.* **191**, 3569–3579 (2009).
 30. Halling, S. M. *et al.* Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* **187**, 2715–2726 (2005).
 31. Chain, P. S. G. *et al.* Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic brucellae. *Infect. Immun.* **73**, 8353–8361 (2005).
 32. Delvecchio, V. G. *et al.* The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 443–448 (2002).
 33. Pandit, D. & Pandit, P. Human Brucellosis: Are we neglecting an enemy at the backyard? *Med. J. Dr. D.Y. Patil Univ.* **6**, 350 (2013).
 34. Wattam, A. R. *et al.* Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *MBio* **3**, e00246-12 (2012).
 35. Ficht, T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiol.* **5**, 859–866 (2010).
 36. Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Verger, J. M., Grayon, M. & Fernández-Lago, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and Infection* vol. 2 1089–1100 (2000).
 37. Buddle, M. B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in new zealand and australia. *J. Hyg. (Lond)*. **54**, 351–364 (1956).
 38. Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M. & Jacob, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J. Med. Microbiol.* **54**, 457–461 (2005).

39. Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckert, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2688–2693 (2007).
40. Scholz, H. C. *et al.* *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 375–382 (2008).
41. Scholz, H. C. *et al.* *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. 801–808 (2010).
42. Whatmore, A. M. *et al.* *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 4120–4128 (2014).
43. Scholz, H. C. *et al.* *Brucella vulpis* sp. Nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 2090–2098 (2016).
44. Hammerl, J. A. *et al.* Analysis of the first temperate broad host range Brucellaphage (BiPBO1) isolated from *B. inopinata*. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
45. Mühlendorfer, K. *et al.* The role of ‘atypical’ *Brucella* in amphibians: are we facing novel emerging pathogens? *J. Appl. Microbiol.* **122**, 40–53 (2017).
46. Tiller, R. V *et al.* Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. (2010).
47. Eisenberg, T. *et al.* Isolation of potentially novel *Brucella* spp. From frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3753–3755 (2012).
48. Wibbelt, G., Szentiks, C. A., Fischer, D., Holger, C. & Eisenberg, T. The role of ‘atypical’ *Brucella* in amphibians: Are we facing novel emerging pathogens? (2016).
49. Scholz, H. C. & Vergnaud, G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *OIE Rev. Sci. Tech.* **32**, 149–162 (2013).
50. Al Dahouk, S. *et al.* Intraspecies diodiversity of the genetically homologous species *Brucella microti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1534–1543 (2012).
51. Le Flèche, P. *et al.* Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* **6**, (2006).
52. Whatmore, A. M., Perrett, L. L. & MacMillan, A. P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* **7**, (2007).
53. Whatmore, A. M. *et al.* Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella* : Phylogeography and Relationship to Biovars. **7**, 1–14 (2016).
54. Foster, J. T. *et al.* Genotyping of *Brucella* species using clade specific SNPs. *BMC Microbiol.* **12**, (2012).
55. Rajashekar, G., Glasner, J. D., Glover, D. A. & Splitter, G. A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* **186**, 5040–5051 (2004).
56. Wattam, A. R. *et al.* Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. *J. Bacteriol.* **196**, 920–930 (2014).
57. Foster, J. T. *et al.* Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* **191**, 2864–2870 (2009).

58. Olsen, S. C. & Palmer, M. V. Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years. *Vet. Pathol.* **51**, 1076–1089 (2014).
59. Tiller, R. V. *et al.* 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.* **47**, 2226–2231 (2009).
60. Moreno, E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Rev.* **45**, 1–22 (2021).
61. Hördt, A. *et al.* Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
62. Dornand, J. *et al.* The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.* **90**, 383–394 (2002).
63. McDermott, J., Grace, D. & Zinsstag, J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *OIE Rev. Sci. Tech.* **32**, 249–261 (2013).
64. De Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A. & Adams, L. G. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am. J. Pathol.* **185**, 1505–1517 (2015).
65. Gorvel, J. P. ‘If you bring an alarm, we will destroy it,’ said *Brucella* to the host cell. *Virulence* **5**, 460–462 (2014).
66. Simborio, H. L. T. *et al.* Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. *Microb. Pathog.* **83–84**, 41–46 (2015).
67. Grilló María Jesús, Blasco José María, Gorbel Jean Pierre, Moriyón Ignacio & Moreno Edgardo. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.* 1–35 (2012).
68. Roop, R. M., Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. Survival of the fittest: How *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 221–238 (2009).
69. Barquero-Calvo, E. *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**, (2007).
70. Lamontagne, J. *et al.* Proteomics-based confirmation of protein expression and correction of annotation errors in the *Brucella abortus* genome. *BMC Genomics* **11**, (2010).
71. Gomez, G., Adams, L. G., Rice-Ficht, A. & Ficht, T. A. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 1–15 (2013).
72. Hull, N. *et al.* Optimization of *Brucella abortus* Protocols for Downstream Molecular Applications. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018).
73. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases* vol. 6 91–99 (2006).
74. Pappas, G. The changing *Brucella* ecology: Novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**, S8–S11 (2010).
75. EFSA (European Food Safety Authority) & 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 J.* **12**, (2014).
76. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Brucellosis Annual Epidemiological Report for 2017. *Surveill. Rep.* 1–6 (2019).
 77. Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012. **II**, 17 (2014).
 78. Gwida, M. *et al.* Brucellosis - Regionally emerging zoonotic disease? *Croat. Med. J.* **51**, 289–295 (2010).
 79. Doganay, M. Human Brucellosis: Importance of Brucellosis. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **8**, 2–3 (2013).
 80. Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H. & Smits, H. L. Human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases* vol. 7 775–786 (2007).
 81. Singh, K. Laboratory-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 142–147 (2009).
 82. Yuan, W., Zhang, M., Zou, H., Gao, X. & Luan, Y. Emergency response to occupational brucellosis in a pharmaceutical manufacturing enterprise. *J. Occup. Health* **60**, 404–409 (2018).
 83. Baldi, P. C. & Giambartolomei, G. H. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. *OIE Rev. Sci. Tech.* **32**, 117–125 (2013).
 84. Doganay, M. & Aygen, B. Human brucellosis: An overview. *Int. J. Infect. Dis.* **7**, 173–182 (2003).
 85. Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., Bowen, M. D. & Hoffmaster, A. R. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 697–702 (2010).
 86. Wiwanitkit, V. Human brucellosis. *Casp. J. Intern. Med.* **7**, 232–232 (2016).
 87. Dean, A. S. *et al.* Clinical Manifestations of Human Brucellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
 88. Solera, J. Update on brucellosis: Therapeutic challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**, (2010).
 89. Lubani, M. M. *et al.* A multicenter therapeutic study of 1100 children with brucellosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**, 75–78 (1989).
 90. Yousefi-Nooraie, R., Mortaz-Hejri, S., Mehrani, M. & Sadeghipour, P. Antibiotics for treating human brucellosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **10**, CD007179–CD007179 (2012).
 91. Alikhani, M. Y., Hashemi, S. H., Naseri, Z., Farajnia, S. & Peeri-Dogaheh, H. Diagnosis of human brucellosis by blood culture (BACTEC) and PCR method via whole blood and serum. *Jundishapur J. Microbiol.* **6**, 248–251 (2013).
 92. Elfaki, M. G., Al-Hokail, A. A., Nakeeb, S. M. & Al-Rabiah, F. A. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med. Sci. Monit.* **11**, (2005).
 93. Christopher, S., Umapathy, B. L. & Ravikumar, K. L. Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. *J. Lab. Physicians* **2**, 055–060 (2010).
 94. Al Dahouk, S., Sprague, L. D. & Neubauer, H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *OIE Rev. Sci. Tech.* **32**, 177–188 (2013).
 95. 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. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1211–1218 (2007).
96. Queipo-ortuño, M. I., Morata, P., Ocón, P., Machado, P. & De Dios Colmenero, J. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2927–2930 (1997).
 97. Hinić, V. *et al.* Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods* **75**, 375–378 (2008).
 98. Colmenero, J. D. *et al.* Real time polymerase chain reaction: A new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 1025–1027 (2005).
 99. De Santis, R. *et al.* High throughput MLVA-16 typing for *Brucella* based on the microfluidics technology. *BMC Microbiol.* **11**, 60 (2011).
 100. Lee, S. *et al.* Evaluation and Selection of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Primers for Genotyping *Brucella abortus* Biovar 1 Isolated from Human Patients. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* **4**, 265–270 (2013).
 101. Garibyan, L. & Avashia, N. Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1–4 (2013).
 102. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* vol. 107 1–8 (2016).
 103. Maiden, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3140–3145 (1998).
 104. Maiden, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 561–588 (2006).
 105. Urwin, R. & Maiden, M. C. J. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* vol. 11 479–487 (2003).
 106. Enright, M. C. & Spratt, B. G. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* vol. 7 482–487 (1999).
 107. Aanensen, D. M. & Spratt, B. G. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**, 728–733 (2005).
 108. Ibarz Pavón, A. B. & Maiden, M. C. J. Multilocus sequence typing. *Methods Mol. Biol.* **551**, 129–140 (2009).
 109. Le Flèche, P. *et al.* Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* **6**, (2006).
 110. Dorneles, E. M. S. *et al.* Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16). *BMC Microbiol.* **14**, 1–8 (2014).
 111. Bricker, B. J., Ewalt, D. R. & Halling, S. M. *Brucella* ‘HOOF-Prints’: Strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* **3**, 1–13 (2003).
 112. AM, W. *et al.* Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1982–1993 (2006).
 113. Garofolo, G., Ancora, M. & Di Giannatale, E. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using

- multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **92**, 103–107 (2013).
114. Ohtsuki, R. *et al.* Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1815–1823 (2008).
 115. Suarez-Esquivel, M. *et al.* *Brucella neotomae* Infection in Humans , Costa Rica. (2017).
 116. Jaý, M. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of *Brucella microti*-like bacteria from a Domestic Marsh Frog (Pelophylax ridibundus). *Front. Vet. Sci.* **5**, 1–7 (2018).
 117. Dahouk, S. Al *et al.* *Brucella vulpis* sp . nov ., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). 2090–2098 (2016).
 118. Fischer, D. *et al.* Abscesses associated with a *Brucella inopinata* – like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). (2012).
 119. Soler-Illoréns, P. F. *et al.* A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. **6**, 1–16 (2016).
 120. Pelerito, A. *et al.* Human brucellosis in Portugal—Retrospective analysis of suspected clinical cases of infection from 2009 to 2016. *PLoS One* **12**, 1–7 (2017).
 121. Al Dahouk, S. & Nöckler, K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* vol. 9 833–845 (2011).
 122. Díaz, R., Casanova, A., Ariza, J. & Moriyón, I. The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
 123. Garshasbi, M., Ramazani, A., Sorouri, R., Javani, S. & Moradi, S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. *Brazilian J. Microbiol.* **45**, 533 (2014).
 124. Sanjuan-Jimenez, R., Colmenero, J. D. & Morata, P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clin. Chim. Acta.* **469**, 1–9 (2017).
 125. Dal, T., Açıkgöz, Z. C., Başyiğit, T., Zeybek, H. & Durmaz, R. Comparison of two commercial DNA extraction kits and pcr master mixes for the detection of *Brucella* from blood samples and blood culture bottles. *Mikrobiyol. Bul.* **52**, 135–146 (2018).
 126. Kumar, V. *et al.* PCR Based Molecular Diagnostic Assays for Brucellosis: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **8**, 2666–2681 (2019).
 127. Zerva, L., Bourantas, K., Mitka, S., Kansouzidou, A. & Legakis, N. J. Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1661 (2001).
 128. Morata, P., Queipo-Ortuño, M. I. & De Dios Colmenero, J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2443–2446 (1998).
 129. Navarro, E., Casao, M. A. & Solera, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **4**, 115–123 (2004).
 130. Matrone, M. *et al.* Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* pcr detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Brazilian J. Microbiol.* **40**, 480–489 (2009).

131. Pappas, G. & Papadimitriou, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**, 29–31 (2007).
132. Gamazo, C., Vitas, A. I., Lopez-Goni, I., Diaz, R. & Moriyon, I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR730, a nonradiometric system for hemocultures. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 3200–3203 (1993).
133. Navarro, E., Escribano, J., Fernández, J. . & Solera, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**, 147–151 (2002).
134. Debeaumont, C., Falconnet, P. A. & Maurin, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 842–845 (2005).
135. Rantakokko-Jalava, K. & Jalava, J. Optimal DNA Isolation Method for Detection of Bacteria in Clinical Specimens by Broad-Range PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4211 (2002).
136. Mancilla, M., Ulloa, M., Lopez-Goi, I., Moriyan, I. & Maria Zarraga, A. Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. *BMC Microbiol.* **11**, (2011).
137. Gyuranecz, M. *et al.* Natural IS711 insertion causing omp31 gene inactivation in *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **25**, 234–238 (2013).
138. Yagupsky, P., Morat, P. & Colmenero, J. D. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, (2020).
139. Paul, S. *et al.* Genome-wide unique insertion sequences among five *Brucella* species and demonstration of differential identification of *Brucella* by multiplex PCR assay. *Sci. Rep.* **10**, 1–11 (2020).
140. Huang, S. K., Yi, M., Palmer, E. & Marsh, D. G. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J. Immunol.* **154**, (1995).
141. Tajadini, M., Panjehpour, M. & Javanmard, S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv. Biomed. Res.* **3**, 85 (2014).
142. Orlando, C., Pinzani, P. & Pazzagli, M. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**, 255–269 (1998).
143. Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–85 (2005).
144. Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. & Rasmussen, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130–138 (1997).
145. Mackay, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190–212 (2004).
146. Wilhelm, J., Pingoud, A. & Hahn, M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res.* **31**, e56 (2003).
147. Franc, K., Krecek, R., Hasler, B. & Arenas-Gamboa, A. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* **18**, (2018).
148. Valdezate, S., Navarro, A., Villalon, P., Carrasco, G. & Saez-Nieto, J. Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB

- typing. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2734–2740 (2010).
149. Kattar, M. *et al.* Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3935–3940 (2008).
 150. Georgi, E. *et al.* Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS ONE* vol. 12 (2017).
 151. Pisarenko, S. V. *et al.* Global evolution and phylogeography of *Brucella melitensis* strains. *BMC Genomics* **19**, (2018).
 152. Hanot Mambres, D. *et al.* Imported human brucellosis in Belgium: Bio and molecular typing of bacterial isolates, 1996-2015. *PLoS One* **12**, (2017).
 153. Pinto, M. *et al.* Insights into the population structure and pan-genome of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Genet. Evol.* **67**, 126–135 (2019).
 154. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
 155. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 (2012).
 156. Walker, B. J. *et al.* Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* **9**, e112963 (2014).
 157. Zerbino, D. R. & Birney, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **18**, 821–829 (2008).
 158. Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C. & Vergnaud, G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* **90**, 660–668 (2008).
 159. Chen, Y. *et al.* Development of an extended multilocus sequence typing for genotyping of *Brucella* isolates. *J. Microbiol. Methods* **86**, 252–254 (2011).
 160. Ashford, R. T., Muchowski, J., Koylass, M., Scholz, H. C. & Whatmore, A. M. Application of Whole Genome Sequencing and Pan-Family Multi-Locus Sequence Analysis to Characterize Relationships Within the Family Brucellaceae. *Front. Microbiol.* **11**, 1329 (2020).
 161. Suárez-Esquivel, M. *et al.* Persistence of *Brucella abortus* lineages revealed by genomic characterization and phylodynamic analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, 1–18 (2020).
 162. Pelerito, A., Nunes, A., Nuncio, M. S. & Gomes, J. P. Genome-scale approach to study the genetic relatedness among *Brucella melitensis* strains. *PLoS One* **15**, (2020).
 163. Vergnaud, G. *et al.* Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974-2006. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
 164. Al Dahouk, S. *et al.* Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods* **69**, 137–145 (2007).
 165. Her, M. *et al.* A genetic comparison of *Brucella abortus* isolates from animals and humans by using an MLVA assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1750–1755 (2010).
 166. Pelerito, A. *et al.* Genetic Characterization of *Brucella* spp.: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. *Front. Microbiol.* **12**, 1–8 (2021).

Material Suplementar

Tabela S1 – Lista dos soros selecionados para o procedimento experimental. A lista inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
364	19/655	27/08/2019 14:48	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
572	19/1005	28/08/2019 14:45	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
1037	19/1866	02/09/2019 14:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
1091	19/1968	03/09/2019 10:40	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
2142	19/3923	11/09/2019 11:59	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
2756	19/5064	13/09/2019 14:44	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
2757	19/5072	13/09/2019 14:55	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
3088	19/5598	17/09/2019 11:42	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
3095	19/5608	17/09/2019 11:53	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
3109	19/5639	17/09/2019 12:15	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
4265	19/7948	25/09/2019 11:41	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
5107	19/9434	01/10/2019 10:34	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
5456	19/10007	03/10/2019 08:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
5836	19/10661	04/10/2019 15:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
6089	19/11044	08/10/2019 10:09	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
7882	19/14550	18/10/2019 13:18	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
8235	19/15308	22/10/2019 12:37	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
10421	19/18618	04/11/2019 12:17	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
10558	19/18804	04/11/2019 15:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
12138	19/21202	12/11/2019 10:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
12933	19/22666	14/11/2019 13:40	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
13337	19/23182	15/11/2019 14:19	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
15068	19/25806	22/11/2019 12:20	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Legionella</i>
16088	19/27508	28/11/2019 11:03	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
16096	19/27529	28/11/2019 11:16	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
16200	19/27691	28/11/2019 13:30	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
17663	19/30107	06/12/2019 11:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
17853	19/30579	09/12/2019 09:50	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
17873	19/30620	09/12/2019 10:58	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
18235	19/31272	10/12/2019 15:07	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
20035	19/34587	19/12/2019 12:52	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
20593	19/35686	26/12/2019 15:35	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Legionella</i>
21001	20/88	02/01/2020 12:00	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
21005	20/92	02/01/2020 12:16	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
21007	20/94	02/01/2020 12:25	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
21011	20/98	02/01/2020 12:33	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
21672	20/1098	07/01/2020 12:09	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
21980	20/1577	08/01/2020 11:25	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
22773	20/2910	13/01/2020 10:56	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
23568	20/4280	16/01/2020 10:59	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
23654	20/4386	16/01/2020 12:48	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>

Tabela S1 - Lista dos soros selecionados para o procedimento experimental. A lista inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
24761	20/6255	22/01/2020 12:02	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
24851	20/6415	22/01/2020 14:59	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
25254	20/7061	24/01/2020 11:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
25370	20/7225	24/01/2020 16:51	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
25747	20/7825	28/01/2020 12:37	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
25753	20/7836	28/01/2020 12:45	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
25762	20/7846	28/01/2020 12:53	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
25954	20/8125	29/01/2020 11:12	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
25957	20/8129	29/01/2020 11:15	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
26003	20/8189	29/01/2020 11:43	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
26192	20/8511	30/01/2020 09:45	Liquor/LCR	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
26220	20/8552	30/01/2020 11:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
26225	20/8559	30/01/2020 11:46	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
26225	20/8559	30/01/2020 11:46	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
26672	20/9310	03/02/2020 14:53	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
26743	20/9400	04/02/2020 08:22	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
27222	20/10118	05/02/2020 13:00	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
27252	20/10163	05/02/2020 13:37	Liquor/LCR	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
27537	20/10589	06/02/2020 12:12	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
27645	20/10782	06/02/2020 14:59	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
28170	20/11691	11/02/2020 10:15	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
28365	20/11993	12/02/2020 08:44	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
28484	20/12209	12/02/2020 12:24	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
28512	20/12250	12/02/2020 13:38	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
28555	20/12337	12/02/2020 14:37	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
28871	20/12846	14/02/2020 08:36	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
29304	20/13630	18/02/2020 10:46	Liquor/LCR	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
29815	20/14553	20/02/2020 10:15	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
29928	20/14759	20/02/2020 14:35	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
30040	20/14888	21/02/2020 11:27	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
30209	20/15129	24/02/2020 12:32	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
30703	20/15901	27/02/2020 11:16	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
30709	20/15916	27/02/2020 11:20	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
31827	20/17778	05/03/2020 11:30	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
32689	20/19267	11/03/2020 13:24	Liquor/LCR	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
32775	20/19478	12/03/2020 08:57	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
33131	20/20033	16/03/2020 10:40	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
33602	20/20697	18/03/2020 12:22	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
33606	20/20701	18/03/2020 12:26	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
33731	20/20876	19/03/2020 10:59	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
34644	20/21945	25/03/2020 12:50	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
36417	20/23874	30/03/2020 14:04	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
36724	20/24208	31/03/2020 11:38	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
37346	20/24879	02/04/2020 08:00	Liquor/LCR	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
40324	20/27994	07/04/2020 13:35	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Legionella</i>

Tabela S1 – Lista dos soros selecionados para o procedimento experimental. A lista inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
43372	20/31086	14/04/2020 08:34	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
43378	20/31102	14/04/2020 08:51	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
45745	20/33655	20/04/2020 14:28	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
48313	20/36422	27/04/2020 11:03	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
48961	20/37140	29/04/2020 10:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
48976	20/37159	29/04/2020 11:11	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
48980	20/37163	29/04/2020 11:16	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
52374	20/40782	07/05/2020 10:05	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
52381	20/40790	07/05/2020 10:28	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
54094	20/42700	11/05/2020 10:49	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
54688	20/43354	12/05/2020 14:11	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
55086	20/44077	13/05/2020 13:24	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
58691	20/48280	21/05/2020 11:40	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
61669	20/51833	27/05/2020 12:11	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
62004	20/52343	28/05/2020 12:30	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
64902	20/55414	01/06/2020 11:38	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
66288	20/57013	03/06/2020 15:48	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
67025	20/57816	04/06/2020 13:06	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
67028	20/57819	04/06/2020 13:09	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
67745	20/58615	05/06/2020 12:08	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
71629	20/62546	08/06/2020 10:41	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
72197	20/63221	09/06/2020 13:39	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
75540	20/67133	16/06/2020 11:18	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
75600	20/67219	16/06/2020 12:51	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
75616	20/67235	16/06/2020 13:05	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
76062	20/67806	17/06/2020 10:50	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
76412	20/68273	17/06/2020 15:45	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
76728	20/68655	18/06/2020 10:47	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
77224	20/69279	19/06/2020 10:42	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
78779	20/71054	22/06/2020 14:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
79099	20/71445	23/06/2020 09:49	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
79103	20/71451	23/06/2020 09:58	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
79848	20/72371	24/06/2020 12:02	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
82605	20/75557	29/06/2020 11:08	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
82813	20/75909	29/06/2020 15:29	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
83295	20/76511	30/06/2020 11:51	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
83302	20/76520	30/06/2020 11:53	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
83311	20/76533	30/06/2020 11:56	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
84663	20/78381	02/07/2020 14:56	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
86936	20/80853	06/07/2020 13:39	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
87936	20/82191	08/07/2020 12:22	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
90999	20/85785	14/07/2020 12:23	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
91250	20/86074	15/07/2020 08:38	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
93778	20/89183	21/07/2020 14:41	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
94046	20/89528	22/07/2020 11:43	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>

Tabela S1 – Lista dos soros selecionados para o procedimento experimental. A lista inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
94053	20/89537	22/07/2020 11:56	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
94489	20/90170	23/07/2020 12:55	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
94872	20/90646	24/07/2020 12:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
96435	20/92542	28/07/2020 13:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
97231	20/93690	30/07/2020 11:51	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
97602	20/94173	31/07/2020 10:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
99535	20/96346	04/08/2020 13:27	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
99884	20/96866	05/08/2020 13:18	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
100238	20/97368	06/08/2020 13:08	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
100580	20/97772	07/08/2020 13:02	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
102363	20/99808	11/08/2020 11:01	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
103442	20/101295	14/08/2020 10:47	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
103560	20/101469	14/08/2020 13:26	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
105005	20/103224	18/08/2020 10:23	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
107284	20/106174	24/08/2020 10:36	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
107381	20/106301	24/08/2020 13:06	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
107629	20/106709	25/08/2020 13:17	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
108550	20/107877	27/08/2020 10:36	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
108633	20/107977	27/08/2020 12:11	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
108752	20/108159	27/08/2020 14:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
108768	20/108179	27/08/2020 14:58	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
108954	20/108411	28/08/2020 09:42	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
109133	20/108619	28/08/2020 13:11	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
109137	20/108625	28/08/2020 13:13	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
110362	20/109979	31/08/2020 14:33	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
111048	20/110868	02/09/2020 13:29	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
111293	20/111171	03/09/2020 09:33	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
111996	20/112010	04/09/2020 13:32	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
113236	20/113434	08/09/2020 10:35	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Chlamydia</i>
113807	20/114215	09/09/2020 13:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
113819	20/114227	09/09/2020 14:09	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
114221	20/114776	10/09/2020 13:38	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
115930	20/116816	15/09/2020 10:19	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
116152	20/117081	15/09/2020 14:10	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma</i>
116476	20/117500	16/09/2020 11:55	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
117064	20/118255	17/09/2020 13:45	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>

Tabela S2 - Lista dos soros selecionados com resultado positivo para *Brucella* spp. A lista inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
192	19/371	26/08/2019 13:43	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Brucella</i> pela reacção de Wright / <i>Brucella</i> / brucelose
583	19/1038	28/08/2019 17:46	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Brucella</i> / Brucelose
693	19/1240	29/08/2019 12:27	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Brucella</i> - Reacção 2-ME / Brucelose
793	19/1420	30/08/2019 08:26	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Brucella</i> pela reacção de Wright / <i>Brucella</i> / brucelose
3755	19/6956	20/09/2019 11:17	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Brucella</i> pela reacção de Wright / <i>Brucella</i> / brucelose
5114	19/9447	01/10/2019 10:47	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
5120	19/9453	01/10/2019 11:03	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Brucella</i> / Brucelose
6485	19/11789	09/10/2019 17:18	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
7645	19/15810	23/10/2019 14:00	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
7784	19/14467	18/10/2019 10:18	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
7901	19/14598	18/10/2019 14:48	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
8400	19/15553	23/10/2019 09:54	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
8683	19/16046	24/10/2019 10:19	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
8701	19/16069	24/10/2019 10:55	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
13399	19/23249	15/11/2019 15:27	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
14149	19/24430	20/11/2019 10:53	Soro	Pesquisa de anticorpos IgM para <i>Brucella</i> / Brucelose
16547	19/28195	02/12/2019 09:20	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
23568	20/4280	16/01/2020 10:59	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
29311	20/13638	18/02/2020 10:52	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
30234	20/15158	24/02/2020 13:01	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
61294	20/51404	26/05/2020 09:55	Soro	Pesquisa de anticorpos IgM para <i>Brucella</i> / Brucelose
87305	20/81247	07/07/2020 08:30	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
102907	20/100599	12/08/2020 15:12	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Brucella</i> pela reacção de Wright / <i>Brucella</i> / brucelose
107405	20/106353	24/08/2020 13:52	Soro	Pesquisa de anticorpos IgA para <i>Brucella</i> / Brucelose
122866	20/125524	01/10/2020 09:49	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
136167	20/141802	29/10/2020 10:56	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose
139752	20/145984	05/11/2020 12:12	Soro	Pesquisa de anticorpos totais para <i>Brucella</i> por Imunocaptura (antigo Coombs) / Brucelose

Tabela S3 - Lista dos soros com resultado positivo para a reação de PCR em tempo real, após extração de DNA. A tabela inclui número de requisição, número da amostra, data de entrada, natureza da amostra e qual o parâmetro em avaliação.

Requisição	Amostra	Data de Entrada	Natureza	Parâmetro em Avaliação
364	19/655	27/08/2019 14:48	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
572	19/1005	28/08/2019 14:45	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
2756	19/5064	13/09/2019 14:44	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
2757	19/5072	13/09/2019 14:55	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
4265	19/7948	25/09/2019 11:41	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
5107	19/9434	01/10/2019 10:34	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
6089	19/11044	08/10/2019 10:09	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
10421	19/18618	04/11/2019 12:17	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
10558	19/18804	04/11/2019 15:21	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
12138	19/21202	12/11/2019 10:54	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
12933	19/22666	14/11/2019 13:40	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
13337	19/23182	15/11/2019 14:19	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
16088	19/27508	28/11/2019 11:03	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
16096	19/27529	28/11/2019 11:16	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
16200	19/27691	28/11/2019 13:30	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
17853	19/30579	09/12/2019 09:50	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
17873	19/30620	09/12/2019 10:58	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
18235	19/31272	10/12/2019 15:07	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>C. pneumoniae</i>
20035	19/34587	19/12/2019 12:52	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Leptospira</i>
20593	19/35686	26/12/2019 15:35	Soro	Pesquisa de anticorpos para <i>Legionella pneumophila</i>
29928	20/14759	20/02/2020 14:35	Soro	Pesquisa de anticorpos IgG para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>

Tabela S4 – Estirpes de *Brucella* spp. utilizadas na avaliação da concordância MLVA_WGS versus MLVA_Lab.
(Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

Estirpe ID	Espécie	País e Ano de Isolamento	Hospedeiro	BioSample Accession Number	Run Accession Number	Estudo
MLVA01	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983828	ERR2993143	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA02	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983829	ERR2993144	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA03	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983830	ERR2993162	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA04	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983831	ERR2993153	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA05	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983832	ERR2993139	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA06	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983833	ERR2993160	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA07	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983834	ERR2993142	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA08	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983835	ERR2993136	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA09	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983836	ERR2993147	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA10	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983837	ERR2993149	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA11	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983838	ERR2993150	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA12	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983839	ERR2993161	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA13	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983840	ERR2993154	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA14	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983841	ERR2993133	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA16	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983842	ERR2993159	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA17	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983843	ERR2993141	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA18	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983844	ERR2993132	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA19	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983845	ERR2993146	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA20	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983846	ERR2993135	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA22	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983847	ERR2993145	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA23	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983848	ERR2993138	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA24	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983849	ERR2993152	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA25	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983850	ERR2993155	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA28	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983851	ERR2993137	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA29	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983852	ERR2993163	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA30	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983853	ERR2993151	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA31	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983854	ERR2993140	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA32	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983855	ERR2993157	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA33	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983856	ERR2993148	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA34	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983857	ERR2993158	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA35	<i>Brucella</i> spp.	Alemanha, desc	Desc	ERS2983858	ERR2993134	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA36	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983859	ERR2993156	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
MLVA37	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, desc	Desc	ERS2983860	ERR2993131	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
120-99E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 1999	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952734	ERR2938672	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
167-00E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2000	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952735	ERR2938698	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
170-04E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2004	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952736	ERR2938644	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
194-00E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2000	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952737	ERR2938699	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
204-01E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2001	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952738	ERR2938692	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
213-03E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2003	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952739	ERR2938643	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021

Tabela S4 – Estirpes de *Brucella* spp. utilizadas na avaliação da concordância MLVA_WGS versus MLVA_Lab.
(Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

Estirpe ID	Espécie	País e Ano de Isolamento	Hospedeiro	BioSample Accession Number	Run Accession Number	Estudo
228-03E	<i>B. melitensis</i>	Espanha	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952740	ERR2938694	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
238-04E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2004	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952741	ERR2938691	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
297-04E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2004	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952742	ERR2938671	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
44-07E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2007	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952743	ERR2938683	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
457-06E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2006	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952744	ERR2938657	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
723-07E	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2007	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952745	ERR2938688	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
104-11RK	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, 2011	Desc	ERS2952746	ERR2938681	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
104-12RK	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, 2012	Desc	ERS2952747	ERR2938661	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
104-13RK	<i>B. melitensis</i>	Alemanha, 2013	Desc	ERS2952748	ERR2938652	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
146-10RK	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2010	Desc	ERS2952749	ERR2938678	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
146-12RK	<i>B. melitensis</i>	Espanha, 2012	Desc	ERS2952750	ERR2938648	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
148-9RK	<i>B. melitensis</i>	Bélgica, 2009	Desc	ERS2952751	ERR2938665	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
183-4RK	<i>B. melitensis</i>	Hungria, 2004	Desc	ERS2952752	ERR2938701	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
20Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2002	Cabra	ERS2952753	ERR2938658	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
47Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2001	Ovelha	ERS2952754	ERR2938668	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
357Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2004	Ovelha	ERS2952755	ERR2938653	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
463Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2005	Ovelha	ERS2952756	ERR2938687	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
770Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2007	Ovelha	ERS2952757	ERR2938669	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
782Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2007	Cabra	ERS2952758	ERR2938670	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
804Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2008	Bovino	ERS2952759	ERR2938703	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
918Pa	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2011	Cabra	ERS2952760	ERR2938695	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
1P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2010	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952761	ERR2938677	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
35P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952762	ERR2938664	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
36P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952763	ERR2938682	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
38P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952764	ERR2938646	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
40P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952793	ERR2938685	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
41P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952765	ERR2938690	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
43P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952766	ERR2938702	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
44P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952794	ERR2938656	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
66P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2012	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952795	ERR2938649	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
147P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2013	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952767	ERR2938647	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
165P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2011	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952769	ERR2938679	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
166P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2011	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952796	ERR2938689	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
167P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2011	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952797	ERR2938645	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
168P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2011	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952798	ERR2938651	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
169P	<i>B. melitensis</i>	Portugal, 2014	<i>Homo sapiens</i>	ERS2952770	ERR2938684	Pelerito, <i>et al.</i> , 2020
183-7RK	<i>B. ovis</i>	Hungria, 2007	Desc	ERS2952784	ERR2938660	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
146-11RK	<i>B. abortus</i>	Espanha, 2011	Desc	ERS2952785	ERR2938686	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
256Pa	<i>B. abortus</i>	Portugal, 2005	Bovino	ERS2952786	ERR2938666	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
183-6RK	<i>B. suis</i>	Hungria, 2006	Desc	ERS2952787	ERR2938662	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
4Pa	<i>B. suis</i>	Portugal, 2000	Suíno	ERS2952788	ERR2938697	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021

Tabela S4 – Estirpes de *Brucella* spp. utilizadas na avaliação da concordância MLVA_WGS versus MLVA_Lab.
(Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

Estirpe ID	Espécie	País e Ano de Isolamento	Hospedeiro	BioSample Accession Number	Run Accession Number	Estudo
27Pa	<i>B. suis</i>	Portugal, 2003	Suíno	ERS2952789	ERR2938673	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
183Pa	<i>B. suis</i>	Portugal, 2009	Javali	ERS2952791	ERR2938650	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021
194Pa	<i>B. suis</i>	Portugal, 2011	Suíno	ERS2952792	ERR2938675	Pelerito, <i>et al.</i> , 2021

Desc - Desconhecido

Tabela S5 – Tamanhos esperados de VNTR per locus das sequências de *Brucella* spp. atualmente conhecidas, e valor alélico correspondente. Os dados relativos à estirpe de referência *B. melitensis* 16M encontram-se sublinhados e a negrito. Os 16 marcadores podem ser divididos em dois grupos, um que contém oito microssatélites (painel 1) e um segundo grupo também com oito microssatélites (painel 2A e 2B). Nesta abordagem, os loci são divididos em diferentes painéis que contém níveis crescentes de resolução genética: painel 1, painel 2A e painel 2B. (Adaptado de Le Flèche *et al.*, 2006, e com modificações por Garofolo *et al.*, 2013).

		Valor Alélico																												
Loci		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Painel 1	Bru06	312	446	<u>580</u>	714																									
	Bru08		312	330	<u>348</u>	366	384																							
	Bru11		<u>257</u>	320	383		509		635	698			887		1013	1076														
	Bru12							302	317	332	347	362	377	<u>392</u>	407	422	437	452												
	Bru42	164	289	414	<u>539</u>	664	789	914																						
	Bru43	170	<u>182</u>	194																										
	Bru45		133	<u>151</u>	169	187																								
	Bru55	193	233	<u>273</u>	313	353	393	433			553																			
Painel 2A	Bru18			130	138	<u>146</u>	154	162	170	178	186																			
	Bru19				79	85	91												<u>163</u>	169	175	181	187	193		205				
	Bru21				431	<u>439</u>	447	455	463																					
Painel 2B	Bru04	313	<u>321</u>	329	337	345	353	361	369	377	385	393	401	409	417	425	433	441	449	457	465	473	481	489					529	
	Bru07		134	142	150	<u>158</u>	166	174	182	190	198	206	214	222	230		246													
	Bru09			124	132	140	148	156	<u>164</u>	172	180	188	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284	292					
	Bru16		227	<u>235</u>	243	251	259	267	275	283	291	299	307	315	323	331	337		353											
	Bru30		119	127	135	143	<u>151</u>	159	167	175	183	191	199																	

Tabela S6 - Resultados dos perfis alélicos das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS. (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021); ND – Não determinado.

Estirpe	Bru06		Bru08		Bru11		Bru12		Bru42		Bru43		Bru45		Bru55		Bru18		Bru19		Bru21		Bru04		Bru07		Bru09		Bru16		Bru30	
	MLVA_Lab	MLVA_WGS																														
MLVA20	1	1	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	5	4	4	3	3	5	5	6	6
MLVA28	1	1	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	4	5	4	4	3	3	7	7	5	5
MLVA29	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	4	4	4	4	3	3	5	5	5	5
MLVA30	1	1	5	5	ND	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	ND	8	4	4	4	4	3	3	ND	8	5	5
MLVA32	1	1	ND	5	3	3	ND	14	2	2	4	4	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	5	4	4	3	3	6	6	6	6
MLVA33	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	6	6	3	3	5	5	5	5
MLVA34	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	3	3	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	4	4	3	3	6	6	4	4
MLVA36	1	1	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	46	45	9	8	8	8	4	4	3	3	ND	6	4	4
MLVA37	1	1	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	ND	6	6	4	4	3	3	ND	7	5	5
120-99E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	7	7	7	ND	3	3	4	4	5	5
167-00E	3	3	4	4	3	3	13	13	4	4	2	2	3	3	3	3	4	4	36	36	6	5	2	2	5	5	3	3	4	4	5	5
170-04E	3	3	4	4	3	3	13	13	4	4	3	3	3	3	3	ND	6	6	36	36	6	5	2	2	5	5	6	ND	6	6	4	4
194-00E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	7	7	7	7	3	3	4	4	6	6
204-01E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	ND	41	41	8	8	5	5	7	ND	3	3	6	6	5	5
213-03E	3	3	4	4	2	2	13	13	3	3	2	2	3	3	3	3	8	8	36	36	6	6	2	2	4	4	6	6	3	3	ND	6
228-03E	1	1	5	5	3	ND	13	13	2	2	2	2	3	ND	2	ND	4	4	41	41	8	8	7	ND	7	ND	3	3	4	4	ND	ND
238-04E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	5	7	5	5	3	3	4	4	6	6
297-04E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	38	41	8	8	6	6	7	ND	3	3	4	4	5	5
44-07E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	ND	8	ND	4	4	7	7	3	3	5	5	5	5
457-06E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	5	5	7	ND	3	3	6	6	5	5
723-07E	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	5	5	6	6	3	3	6	6	5	5
104-11RK	2	3	4	4	3	3	13	13	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4	36	36	5	5	2	2	ND	5	3	3	ND	4	5	5
104-12RK	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	8	8	7	7	3	3	7	7	5	5

Tabela S6 - Resultados dos perfis alélicos das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS. (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021); ND – Não determinado.

Estirpe	Bru06		Bru08		Bru11		Bru12		Bru42		Bru43		Bru45		Bru55		Bru18		Bru19		Bru21		Bru04		Bru07		Bru09		Bru16		Bru30	
	MLVA_Lab	MLVA_WGS																														
104-13RK	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	4	4	7	7	3	3	5	5	5	5
146-12RK	2	2	4	4	3	ND	13	13	5	5	2	2	3	3	3	3	6	6	36	36	5	5	2	2	ND	ND	10	10	6	6	5	5
148-9RK	2	2	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	5	5	5	5	36	36	8	8	4	4	5	5	7	7	8	8	5	5
183-4RK	2	ND	3	ND	3	ND	10	13	3	3	1	1	3	3	2	2	4	4	38	38	9	9	2	2	3	3	ND	10	5	5	3	3
1P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	7	ND	3	3	5	5	4	4
35P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	6	ND	3	3	4	4	5	5
36P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	ND	8	ND	6	6	7	ND	3	3	4	4	ND	5
38P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	5	2	4	4	41	41	8	8	6	6	7	ND	3	3	4	4	5	5
40P	3	3	4	4	3	3	14	14	4	4	2	2	3	3	5	3	6	6	36	36	5	5	2	2	5	5	7	7	ND	3	5	5
41P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	7	7	3	3	4	4	5	5
43P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	ND	ND	5	2	4	4	41	41	8	8	5	5	7	7	3	3	4	4	5	5
44P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	5	2	4	4	41	41	ND	ND	6	6	ND	ND	3	3	4	4	5	5
66P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	7	7	ND	ND	3	3	6	6	5	5
147P	3	3	4	4	3	3	13	13	5	5	2	2	3	3	3	3	6	6	36	36	5	5	2	2	8	8	6	6	3	3	5	5
165P	1	1	5	5	3	3	13	13	3	3	2	2	3	3	2	2	5	5	7	9	8	8	3	3	4	4	3	3	4	4	6	6
166P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	ND	8	ND	4	7	7	3	3	4	4	6	5
167P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	3	2	4	4	41	41	8	8	4	4	7	7	3	3	4	4	5	5
168P	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	ND	8	ND	6	ND	7	3	3	4	4	5	5
169P	ND	3	ND	4	ND	3	ND	13	3	3	ND	2	ND	3	2	3	6	6	36	36	5	5	ND	2	ND	6	ND	3	ND	9	5	5
20Pa	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	6	6	7	ND	3	3	4	4	5	5
47Pa	1	1	5	5	3	ND	9	ND	2	2	2	2	3	3	2	2	6	ND	38	41	9	9	6	6	5	5	3	3	4	4	5	5
357Pa	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	10	10	7	7	3	3	5	5	5	5
463Pa	2	2	5	5	8	8	8	8	4	4	1	1	5	5	2	5	4	ND	38	38	9	9	5	5	4	4	9	9	2	2	6	6

Tabela S6 - Resultados dos perfis alélicos das abordagens MLVA_Lab e MLVA_WGS. (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021); ND – Não determinado.

Estirpe	Bru06		Bru08		Bru11		Bru12		Bru42		Bru43		Bru45		Bru55		Bru18		Bru19		Bru21		Bru04		Bru07		Bru09		Bru16		Bru30	
	MLVA_Lab	MLVA_WGS																														
770Pa	3	2	5	5	3	8	9	8	4	4	1	1	5	5	5	5	5	5	38	38	9	9	2	2	ND	ND	ND	9	2	2	ND	8
782Pa	3	3	4	4	3	3	13	13	ND	ND	2	2	3	3	3	3	6	6	36	36	6	5	2	2	5	ND	9	ND	3	3	5	5
804Pa	1	1	5	5	3	3	13	13	2	2	2	2	3	3	2	2	4	4	41	41	8	8	4	4	6	6	3	3	4	4	5	5
918Pa	2	2	5	5	3	8	9	8	3	3	1	1	3	ND	3	5	6	6	38	38	8	9	ND	ND	5	5	3	3	2	2	6	6
146-10RK	4	4	5	5	4	4	11	11	2	2	3	ND	3	3	3	3	6	6	43	43	8	8	3	3	7	7	3	3	3	3	5	5
<i>B. ovis</i>																																
183-7RK	2	2	5	5	8	8	9	8	4	4	1	1	5	5	5	5	6	6	38	38	ND	9	ND	ND	5	5	8	8	2	2	6	6
<i>Brucella suis</i>																																
183-6RK	2	ND	3	3	6	ND	10	ND	3	3	1	1	5	ND	2	ND	4	4	38	38	9	9	ND	ND	5	ND	10	10	5	ND	3	3
4Pa	2	2	5	5	8	8	9	8	4	4	1	1	5	5	5	5	6	6	38	38	9	9	8	8	5	5	4	ND	2	2	6	6
27Pa	2	2	5	5	8	8	8	8	4	4	1	1	5	5	5	5	6	6	38	38	9	9	ND	ND	ND	5	ND	11	2	2	8	8
183Pa	2	2	5	5	8	8	9	8	4	4	1	1	5	5	5	5	6	6	38	38	9	9	ND	ND	5	5	8	8	2	2	6	6
194Pa	2	2	5	5	8	8	9	8	4	4	1	1	5	5	5	5	7	7	36	38	9	9	11	11	4	4	13	13	2	2	6	6
<i>Brucella spp.</i>																																
MLVA22	1	2	3	3	3	ND	10	10	2	2	1	1	5	5	2	2	5	5	36	36	9	9	4	4	5	5	9	9	6	6	3	3
MLVA23	1	1	2	2	9	9	16	16	1	1	2	2	5	5	5	5	7	7	43	43	9	9	9	9	5	5	ND	3	9	9	5	5
MLVA24	2	4	5	5	4	4	11	11	2	2	2	2	3	3	3	3	5	5	43	43	ND	8	3	3	5	5	ND	3	4	4	5	5
MLVA25	2	2	4	3	6	6	9	9	3	3	1	1	5	5	2	2	4	4	38	38	9	9	5	6	6	6	5	5	5	5	3	3
MLVA31	1	4	5	5	4	4	13	12	3	3	3	3	5	5	1	1	6	6	41	41	9	9	5	3	6	6	ND	3	6	6	3	3
MLVA35	3	3	5	5	6	6	12	12	2	2	2	2	5	5	4	4	7	7	43	43	9	9	5	5	5	5	6	6	3	3	3	3

ND – não determinado

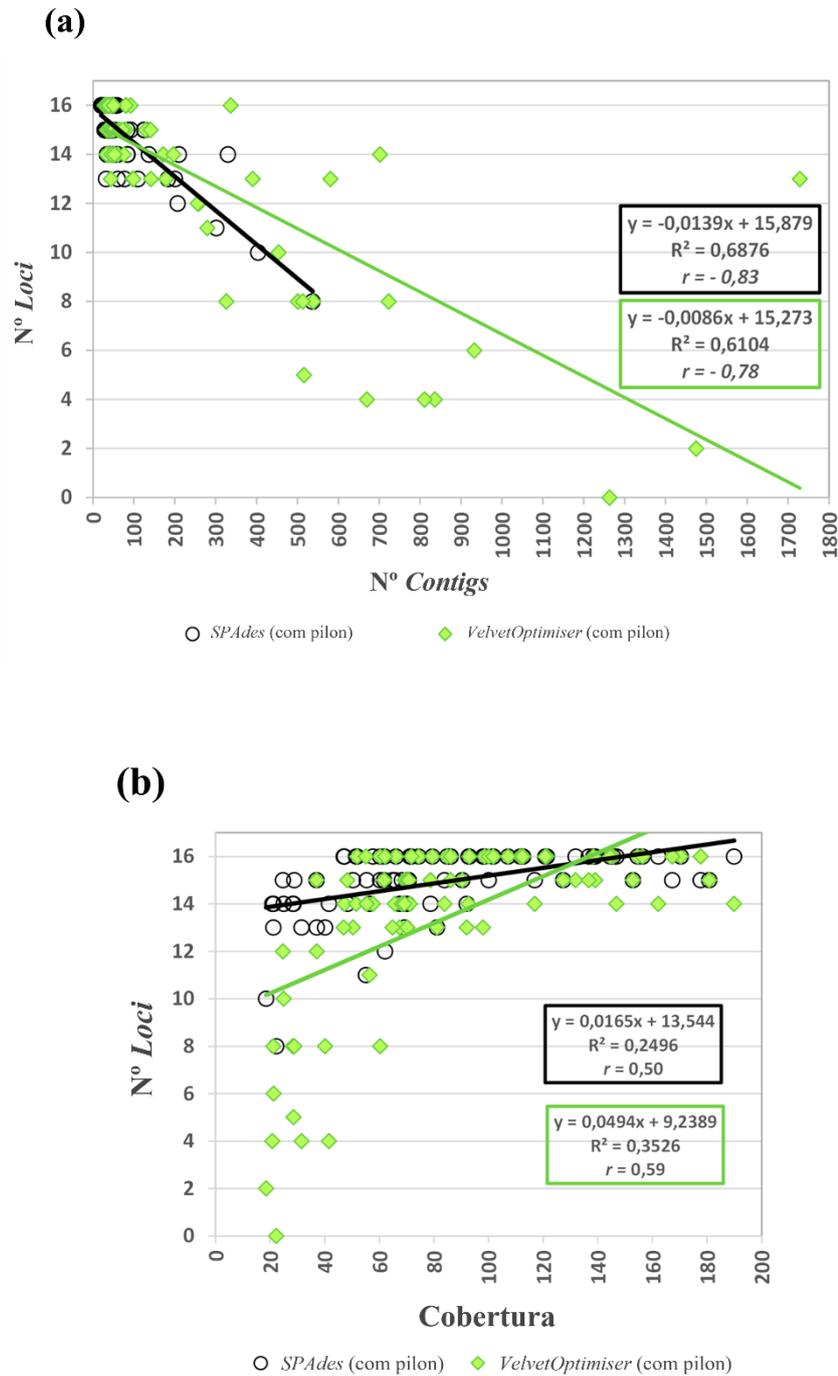


Figura S1 - Influência da qualidade dos genomas montados na eficácia da extração de *loci* do perfil de MLVA_WGS. Os gráficos mostram a correlação da eficácia (medida pelo número de *loci* para os quais foi designado um alelo) do *script* bioinformático com a profundidade de cobertura (painel (a)) e com o número de *contigs* montados (painel (b)), após a melhoria do “*polishing*” da montagem. Dois algoritmos (*SPAdes* e *VelvetOptimiser*) foram utilizados para fazer leituras *de novo* de montagem de cada estirpe (ver métodos para detalhes). O coeficiente de *Pearson* (*r*) é apresentado para ambos os painéis, bem como as linhas de tendência mostradas com as respectivas equações. (Adaptado de Pelerito, *et al.*, 2021).

