PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) DOS GENES IS*711* E *bcsp31* PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE HUMANA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL E SORO

Aluno: Guilherme Nardi Becker

Orientador: Prof. Dr. Felipe Tuon

Curitiba, Novembro/2021

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) DOS GENES IS*711* E *bcsp31* PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE HUMANA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL E SORO

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Tuon

Curitiba, Novembro/2021

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

B395e
2021

Becker, Guilherme Nardi
Estudo comparativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) dos genes IS711 e bcp31 para o diagnóstico de brucelose humana em amostras de sangue total e soro / Guilherme Nardi Becker ; orientador: Felipe Tuon. – 2021.
54, [2] f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021
Bibliografia: f. 47-54

1. Brucelose. 2. Técnicas de diagnóstico molecular. 3. Reação em cadeia de polimerase em tempo real. 4. Testes laboratoriais. 5. Brucella. I. Tuon, Felipe. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.957

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PUBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFICIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **12 dias do mês de novembro de 2021 às 13:30**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **"ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) DOS GENES IS711 E bcsp31 PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE HUMANA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL E SORO"** apresentado por **Guilherme Nardi Becker** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon - Presidente	Felipe Tuon
Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo (PUCPR)	Felipe Tuon
Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira (UFPR)	Felipe Tuon

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon **Conceito:** APROVADO
Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo **Conceito:** APROVADO
Profa. Dra. Keite da Silva Nogueira **Conceito:** APROVADO

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

_____

Felipe Tuon

_____
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Presidente da Banca Examinadora

_____
Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

A dissertação foi elaborada seguindo a normatização para citações e referências de acordo com o *Chicago Manual of Style*, 17ª edição. Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Felipe Tuon nas instalações do *Laboratory of Emerging Infectious Diseases* (LEID da PUCPR) e do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) dentro do Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância em Saúde Para Brucelose Humana no Estado do Paraná, com a contrapartida de tornar-se um exame diagnóstico disponível e incluído no rol de procedimentos do LACEN/PR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização desta dissertação. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da PUCPR (nº 84644718.3.0000.0020).

RESUMO

Introdução: O diagnóstico clínico da brucelose humana (BH) é frequentemente desafiador devido aos sintomas inespecíficos. Geralmente, são necessários exames laboratoriais complementares para confirmação. Os testes imunológicos têm sido o método mais utilizado no diagnóstico de BH, mas os testes moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) vêm se tornando cada vez mais utilizados devido a sua elevada especificidade e sensibilidade. Apesar disso, muitos métodos moleculares ainda necessitam de padronização quanto ao gene alvo, melhor amostra clínica e momento adequado da coleta para o exame. O objetivo deste estudo foi validar um método de qPCR para o diagnóstico de BH; avaliar diferentes genes-alvo de *Brucella* e a influência de matrizes biológicas (soro vs. sangue total) nos parâmetros analíticos.

Material e Métodos: O delineamento experimental para a padronização da pesquisa de BH por qPCR em amostras clínicas constou de três etapas. Na etapa 1, dois genes, IS*711* e *bcsp31*, foram testados quanto ao desempenho analítico para o diagnóstico molecular de BH. Na etapa 2, foram avaliados diferentes tipos de matriz biológica (sangue total e soro) utilizando amostras contaminadas artificialmente com *Brucella abortus*. Na etapa 3, os parâmetros de diagnóstico deste método qPCR foram avaliados em amostras pareadas de sangue total e soro de pacientes com suspeita de BH.

Resultados: Ambos os genes podem ser alvos potenciais de diagnóstico, mas o gene IS*711* mostrou ser um melhor alvo quanto ao limite de detecção (10 vs 20 cópias por reação). No experimento de contaminação in vitro, o sangue total mostrou um limite de detecção menor do que o soro após a regressão probit (224 vs. 3.681 UFC/mL) e a análise ANOVA mostrou uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre o Cq das amostras de sangue total em todas as diluições em relação ao soro. Em 12 amostras clínicas pareadas de pacientes com suspeita de BH, nenhuma amostra de soro e apenas uma amostra de sangue total foi detectável para *Brucella* utilizando este método de detecção qPCR.

Conclusões: Este método padronizado de detecção de *Brucella* baseado em qPCR pode melhorar o diagnóstico de BH, servindo como um teste rápido, altamente sensível e específico. O sangue total é mais adequado para o diagnóstico de BH baseado em qPCR devido à presença de cargas de DNA-alvo mais altas nesta matriz em comparação com o soro. A maior limitação deste estudo foi a impossibilidade de obtenção e realização de hemocultura, método padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de BH.

Palavras-chave: *Brucella;* diagnóstico molecular; testes laboratoriais; Brucelose; qPCR

ABSTRACT

Background: Clinical diagnosis of human brucellosis (HB) is often difficult due to non-specific symptoms. Generally, laboratory tests are necessary to diagnosis confirmation. Immunological tests have been the most common method used in HB diagnosis, but molecular methods based on quantitative polymerase chain reaction (qPCR) have largely replaced these diagnostic methods due the high sensibility and sensitivity. However, some molecular tests still need standardization regarding to target gene, clinical sample and adequate time to specimen collection. The aim of this study was to validate a HB diagnostic qPCR method; assessing different target *Brucella* genes, and the influence of biological matrices (serum vs. whole blood) on analytical parameters.

Material and Methods: Experimental design for *Brucella* detection by qPCR was performed in three steps. In the step 1, two target genes, IS*711* and *bcsp31*, were tested for analytical performance to molecular diagnosis of BH. In step 2, different biological matrices types (whole blood and serum) were evaluated using artificially spiked samples with *Brucella abortus*. In the step 3, diagnostic parameters of this qPCR method were evaluated in paired whole blood and serum samples from patients with suspected HB.

Results: Both genes could be potential diagnosis targets, but IS*711* showed a lower limit of detection (10 vs. 20 copies per reaction). In spiked matrix experiments, whole blood showed a lower limit of detection than serum after probit regression (224 vs. 3,681 CFU/mL) and ANOVA analysis showed a significant (p<0.001) difference between the Cq of whole blood at all dilutions and that of serum. In 12 paired clinical samples from brucellosis suspect patients, no serum samples and only one whole blood sample tested positive for *Brucella* using this qPCR detection method.

Conclusions: This standardized qPCR-based *Brucella* detection method could improve diagnosis of HB, serving as a rapid, highly sensitive, and specific test. Whole blood is better suited to qPCR-based HB diagnosis due to the presence of higher target DNA loads in this matrix, compared to serum. The aim limitation of this study was the impossibility of obtaining and performing blood cultures, the gold-standard method for laboratory diagnosis for HB.

Keywords: *Brucella*; molecular diagnosis; laboratorial tests; brucellosis; PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de contaminação *in vitro*

Figura 2 – Curva Padrão para os Genes IS*711* e *bcsp31*

Figura 3 – Curva Padrão para Amostras Contaminadas – Sangue Total, Soro e Solução Salina

Figura 4 – $LOD_{95\%}$ estimado após Regressão Probit – Sangue Total, Soro e Solução Salina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de *Brucella* atualmente descritas

Tabela 2 – Espécies de *Brucella* associadas a infecções em humanos

Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste estudo para qPCR

Tabela 4 - Valores aceitáveis para padronização analítica

Tabela 5 – Resultados da determinação do $LOD_{95\%}$

Tabela 6 – Parâmetros determinados a partis dos resultados da Curva Padrão

Tabela 7 – $LOD_{95\%}$ estimado após Regressão Probabilística em UFC/mL

Tabela 8 – Resultado da validação clínica do qPCR

LISTA DE ABREVIAÇÕES

***bcsp31* –** Gene 31-kDa salt-extractable immunogenic protein

BH – Brucelose humana

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

Cq – Ciclo do threshold/quantificação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

GE – Equivalentes genômicos

IS*711* – Gene sequência de inserção *711*

LOD – Limite de Detecção

MALDI-TOF – Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de Voo

PCR – Reação da polimerase em cadeia

qPCR – Reação da polimeração em cadeia em tempo real

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... **12**

1.1 GÊNERO *BRUCELLA*..... **14**

1.2 GÊNERO *BRUCELLA* COMO AGENTES DE ZOONOSE..... **15**

1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... **19**

2 JUSTIFICATIVA..... **21**

3 OBJETIVOS..... **22**

3.1 OBJETIVOS GERAIS..... **22**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... **22**

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... **23**

4.1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DA qPCR PARA OS GENES IS*711* E *BCSP31*..... **23**

4.2 EXPERIMENTO DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*..... **27**

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS..... **29**

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA..... **30**

4.5 ANALÍSES ESTATÍSTICAS..... **30**

5 RESULTADOS..... **31**

5.1 ETAPA 1 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA **31**

5.2 ETAPA 2 – ESTUDO DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*..... **34**

5.3 VALIDAÇÃO CLÍNICA DO qPCR..... **37**

6 DISCUSSÃO..... **39**

7 CONCLUSÃO..... **45**

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... **46**

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **47**

10 APÊNDICES..... **55**

1. INTRODUÇÃO

A brucelose humana (BH) é uma zoonose com importante impacto clínico e econômico. Apesar da baixa mortalidade (inferior a 1%), apresenta um alta morbidade, geralmente prolongada (P. Yagupsky 1999; Hull and Schumaker 2018), devido a capacidade de cronificação e possibilidade de relapso. O tratamento antimicrobiano geralmente é prolongado (semanas a meses), mesmo em casos não complicados e, após confirmado o diagnóstico, os pacientes necessitam de acompanhamento médico por até dois anos, inclusive com realização periódica de exames laboratoriais (Tuon et al. 2017). A infecção por *Brucella* em rebanhos e animais de criação também geram significativos impactos sociais e econômicos, devido à perda de produtividade e diminuição de reprodução animal (Lokamar et al. 2020). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, a perda econômica anual devido a brucelose bovina na América Latina é estimada em 600 milhões de dólares (Acha and Szyfres 2005). No Brasil, apesar de dados limitados, a perda anual em rebanhos bovinos de corte e de leite foi estimada em 892 milhões de reais em 2011 (Santos et al. 2013). A introdução do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi um importante avanço no controle da Brucelose Bovina no Brasil, mas o objetivo principal de erradicação ainda não foi atingido, principalmente, devido a diferença do nível de controle entre os estados do Brasil (Aires, Coelho, and Silveira Neto 2018; Rodrigues et al. 2021).

A doença é causada por *Brucella* spp., um bacilo Gram-negativo intracelular transmitido por diferentes fontes ao homem incluindo, mas não limitado, à ingestão de produtos lácteos contaminados, manipulação de animais infectados, acidentes com a vacina contra *Brucella* e acidentes laboratoriais. A incidência anual varia de 0,3 casos por milhão em alguns países desenvolvidos a superior a 1.000 casos por milhão em áreas endêmicas (Pappas et al. 2006; Doganay 2013). Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde, mesmo em países

desenvolvidos, a incidência de brucelose pode ser pelo menos cinco vezes maior do que a oficialmente relatada, em decorrência dos casos subdiagnosticados e subnotificados (Ariza et al. 2007).

A BH possui diversas apresentações clínicas, incluindo síndrome sistêmica febril, geralmente acompanhada de suor, calafrios e fadiga, mas também algumas apresentações localizadas, como epidídimo-orquite e espondilodiscite. Neurobrucelose e endocardite são apresentações graves da doença (Dean et al. 2012), com a mortalidade associada à doença grave (Tuon et al. 2017). O diagnóstico de BH é um desafio. Os sintomas das formas aguda e crônica são inespecíficos, portanto, os dados epidemiológicos são indispensáveis para a suspeita clínica e diagnóstico diferencial, e frequentemente são necessários exames laboratoriais complementares (Lemos et al. 2018). Os métodos de diagnóstico laboratorial incluem cultura, imuno-histoquímica e detecção de ácidos nucléicos usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes imunológicos têm sido o método mais comum para o diagnóstico de BH, entretanto, os anticorpos podem apresentar reação cruzada para outras bactérias e apresentam dificuldade em diferenciar relapso de uma infecção passada. A cultura de sangue periférico (hemocultura) é o método padrão ouro para o diagnóstico de BH, mas, apesar da alta especificidade (100%), apresenta baixa sensibilidade (10 – 30%) e requer nível de biossegurança 3 para manipulação de isolados, podendo ser uma importante fonte de contaminação e acidentes laboratoriais. Ao contrário, os métodos moleculares são pouco prováveis de serem fontes de acidentes laboratoriais, apresentando a tendência de substituir os métodos convencionais de cultura para diagnóstico e identificação de *Brucella* (Araj 2010).

Apesar de poder apresentar uma sensibilidade maior que a cultura e uma especificidade maior que os testes sorológicos, ainda há algumas indefinições quanto ao uso dos métodos moleculares para o diagnóstico de BH (Center for Disease Control and Prevention 2017).

Em relação ao melhor alvo, diversos genes já foram descritos para pesquisa de *Brucella*, com diferente resultados para especificidade e sensibilidade, sem que haja um consenso sobre o melhor gene (Pablo Yagupsky, Morata, and Colmenero 2020). Quanto a amostra clínica de escolha para a pesquisa molecular de *Brucella*, os resultados encontrados são divergentes em relação a escolha de soro ou sangue total, onde alguns estudos demonstram melhor sensibilidade em soro e outros em sangue total (Zerva et al. 2001; Mitka et al. 2007). Portanto, para apresentarem melhor sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais, os testes moleculares precisam ser padronizados e bem delineados.

1.1 GÊNERO *BRUCELLA*

O gênero *Brucella* foi estabelecido por Meyer e Shaw em 1920 e atualmente é formado por 12 espécies (Parte 2018) (Tabela 1). As espécies de *Brucella* são historicamente designadas de acordo com os hospedeiros que infectam primariamente, patogenicidade e características fenotípicas (Parte 2018; Banai and Corbel 2014). Análises de hibridação DNA-DNA realizadas com isolados de *Brucella* em 1985 sugeriram que todas as espécies do gênero pertencem a uma única espécie por apresentarem uma homologia superior a 90%, tendo sido proposto a denominação de biovares de *Brucella melitensis* (ex.: *Brucella melitensis* biovar *Abortus*) (Verger et al. 2009). Mesmo com a alta homologia, esta classificação não tem sido aceita devido à falha deste método em explicar as diferenças de comportamento biológico entre as espécies, bem como a presença de genes espécie específicos e divergências sorológicas frente a epítopos de lipopolissacarídeo (LPS) de membrana celular presente nas espécies de *Brucella* (Parte 2018; Moreno and Moriyón 2006). Do ponto de vista epidemiológico e de controle de saúde pública, a diferença entre as espécies determinada pela taxonomia clássica ainda é uma importante ferramenta de controle, visto as diferenças encontradas em relação a interação parasita-hospedeiro e

virulência entre as espécies. Desta maneira a taxonomia do gênero permanece com a nomenclatura de espécies clássicas, mesmo sendo aceito que do ponto de vista genético o gênero seja formado somente por uma única espécie (Corbel and Moriyón 2006).

Tabela 1 – Espécies de *Brucella* atualmente descritas

Espécie	Descrição	Hospedeiro Natural
Brucella abortus	(Schmidt 1901) Meyer and Shaw	Bovinos
Brucella melitensis	Hughes 1893) Meyer and Shaw	Caprinos e Camelos
Brucella suis	Huddleson 1929, *species*	Suínos
Brucella ovis	Buddle 1956, *species*.	Ovelhas
Brucella neotomae	Stoennerand Lackman 1957, *species.*	Rato selvagem
Brucella canis	Carmichaeland Bruner 1968, *species*.	Canídeos
Brucella ceti	Foster *et al.* 2007, sp. nov.	Cetáceos
Brucella pinnipedialis	Foster *et al.* 2007, sp. nov.	Focas e Cetáceos
Brucella microti	Scholz *et al.* 2008, sp. nov.	Rato silvestre
Brucella inopinata	Scholz *et al.* 2010, sp. nov.	Desconhecido
Brucella papionis	Whatmore *et al.* 2014, sp. nov.	Babuínos
Brucella vulpis	Scholz *et al.* 2016, sp. nov.	Raposa

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN. Adaptado de https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella

1.2 GÊNERO *BRUCELLA* COMO AGENTES DE ZOONOSE

A evolução das espécies de *Brucella* permitiu uma estreita coevolução com as células dos mamíferos que infectam, necessitando desta interação para a manutenção da espécie, levando até mesmo, a associação das espécies com diferentes hospedeiros (Moreno and Moriyón 2006; Głowacka et al. 2018). São reconhecidas como patógenos primários de animais (Ficht 2010), sendo o ser humano considerado um hospedeiro acidental.

O potencial zoonótico é um importante fator de classificação das espécies de *Brucella* (Moreno and Moriyón 2006). *B. abortus, B. melitensis e B. suis* são as principais espécies de interesse humano responsáveis pela BH (Moreno and Moriyón 2006; Al Dahouk et al. 2017). *B. canis* também é incluída como potencial agente de doença em humanos, mas apresenta um potencial zoonótico menor (Lucero et al. 2005; Corbel 2006). As espécies isoladas de mamíferos aquáticos, *B. ceti e B. pinnipedialis* são consideradas potenciais agentes de doença em seres humanos, devido aos casos de neurobrucelose relacionados a essas espécies (Sohn et al. 2003). As demais espécies do gênero, até o momento, não são consideradas agentes causadores de doença em seres humanos, e seu potencial zoonótico é desconhecido (Pappas et al. 2005; Corbel 2006; Fugier, Pappas, and Gorvel 2007)

A infecção primária por *Brucella* em animais apresenta-se como uma doença subaguda ou crônica, geralmente não sendo aparente na sua fase inicial (Corbel 2006). Na maioria dos casos, a infecção ocorre através da via gastrointestinal, atingindo a via linfática com posterior translocação para a corrente sanguínea. Devido à capacidade de multiplicação dentro dos macrófagos, após a bacteremia ocorre a distribuição das células de *Brucella* a outros órgãos, com tropismo pelo útero grávido, órgãos genitais masculinos e femininos e glândulas mamárias, inclusive podendo levar à mastite e eliminação pelo leite (Hull and Schumaker 2018; Rhyan 2013). O sinal mais característico da infecção por *Brucella* em animais é o aborto espontâneo. Outros sintomas são aumento da temperatura, perda da fertilidade tanto em machos quanto em fêmeas e diminuição da lactação (Sohn et al. 2003; Hull and Schumaker 2018). Apesar de em muitas situações a infecção não ser aparente e ser subclínica em animais adultos, a brucelose em animais de criação leva a importantes perdas econômicas, devido à diminuição da produtividade tanto para produção de animais de corte como para produção de leites e derivados (Santos et al. 2013).

A transmissão da *Brucella* para humanos ocorre basicamente por contato direto com animais doentes e seus produtos através da inalação, ingestão, contato com a mucosa ou feridas abertas (Pappas et al. 2005; Hull and Schumaker 2018), ocorrendo de maneira semelhante para todas as espécies patogênicas (Moreno and Moriyón 2006). As células de *Brucella* invadem os tecidos penetrando através das células epiteliais sendo, então, fagocitadas. A divisão celular e multiplicação acontece nos linfonodos com translocação para a corrente sanguínea, levando a uma bacteremia transitória e disseminação pelo hospedeiro. Nos humanos, a *Brucella* apresenta tropismo pelo sistema retículo endotelial (sistema mononuclear fagocitário) (Głowacka et al. 2018; Pappas et al. 2005; Fugier, Pappas, and Gorvel 2007). As células de *Brucella* apresentam a capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior de células fagocitárias e não fagocitárias, incluindo células epiteliais. Apesar do mecanismo ainda não ser completamente elucidado, aparentemente as células de *Brucella* são envolvidas por vacúolos intracelulares, onde permanecem viáveis e resistentes a componentes antimicrobianos extracelulares e da digestão intracelular. Dentro do ambiente intracelular, as células de *Brucella* encontram o meio propício para o desenvolvimento e multiplicação (Głowacka et al. 2018; Moreno, Cloeckaert, and Moriyón 2002). Apesar da denominação da doença representar a infecção por qualquer espécie da família *Brucella*, quando citado BH se faz referência a doença causada por *B. abortus, B. melitensis, B. suis* e *B. canis* (Moreno, Cloeckaert, and Moriyón 2002) (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies de *Brucella* associadas a infecções em humanos

Espécie	*Biovares*	Hospedeiro Primário Preferencial	Virulência
B. abortus	Sete biovares	Principal: Bovinos Ocasional: Canídeos, Equinos	Média

	1 – 6 e 9		
B. melitensis	Três biovares 1 – 3	Principal: Caprinos (Cabras, ovelhas) e Camelos Ocasional: Bovinos, Canídeos	Alta
B. suis	Cinco biovares 1 – 5	Principal: Suínos (incluindo javalis e suínos selvagens) para Biovar 1- 3; Renas para biovar 4; Roedores para Biovar 5. Ocasional: Ovelhas	Média - Alta
B. canis	-	Principal: Canídeos	Baixa

Classicamente a doença em humanos é uma doença aguda ou subaguda febril, associada a sudorese, mialgia, artralgia, estado depressivo, cansaço excessivo e anorexia (Dean et al. 2012; Tuon et al. 2017). Esta fase inicial da doença pode durar até 3 meses, com momentos de melhora e retomada dos sintomas. Após este período, em alguns casos, pode ocorrer evolução para a fase crônica e relapso da doença, mesmo com um tratamento primário efetivo, onde o paciente volta a apresentar novamente os sinais e sintomas da fase aguda (Corbel 2006; Center for Disease Control and Prevention 2017). O comprometimento focal pode ocorrer em qualquer fase, afetando principalmente o fígado, baço, sistema nervoso central e válvulas cardíacas. A BH é considerada a principal zoonose bacteriana no mundo e uma doença de extremo interesse em saúde pública devido à capacidade de se tornar uma doença crônica, as altas taxas de morbidade, com relapso ocorrendo em 5 a 30% dos casos (Solera 2010) e ao tratamento antimicrobiano longo (Tuon et al. 2017), podendo chegar até 6 semanas.

1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Devido aos sintomas inespecíficos, o diagnóstico clínico nem sempre é suficiente para a confirmação da doença. Desta maneira, dados epidemiológicos como risco ocupacional, consumo de alimentos potencialmente infectados e área de residência são indispensáveis para a suspeita clínica e diagnóstico diferencial, geralmente necessitando de exames laboratoriais complementares (Tuon et al. 2017; Lemos et al. 2018). Os métodos para diagnóstico laboratorial da BH apresentam diferentes características de acordo com a fase clínica da doença. A hemocultura é positiva na fase aguda da doença, onde também ocorre aumento dos títulos de anticorpos IgM. Na evolução da doença, ocorre declínio dos títulos de IgM e aumento progressivo de IgG. Na infecção crônica ou relapso, o aumento dos títulos de IgG em coletas seriadas pode ser o único exame laboratorial indicativo de BH. Em relação aos métodos moleculares, ainda não há consenso sobre o período de detecção de acordo com as fases da doença (Center for Disease Control and Prevention 2017).

A hemocultura é o método padrão para o diagnóstico laboratorial. Mesmo com a alta especificidade (100%) é um exame com baixa sensibilidade (11-30%). As características fenotípicas das espécies de *Brucella*, como crescimento lento *in vitro*, necessidade de suplementação frente aos meios de cultura tradicionais e baixa carga microbiana em circulação tornam um desafio o isolamento laboratorial (Center for Disease Control and Prevention 2017; Christopher, Umapathy, and Ravikumar 2010). Além disso, a manipulação em cultura de espécies de *Brucella* requer nível 3 de biossegurança devido ao alto risco de geração de aerossol e baixa carga necessária para a infecção em humanos, estrutura que a maioria dos laboratórios clínicos não possui. A cultura de medula óssea seria uma melhor opção para diagnóstico, mas devido à natureza invasiva da coleta, seu uso deve ser restrito a casos específicos (Center for Disease Control and Prevention 2017).

Os testes imunológicos têm sido o método mais utilizado para o diagnóstico laboratorial de BH, entretanto, os anticorpos anti-*Brucella* carecem de especificidade podendo ser reativos em outras doenças infecciosas, além de apresentarem dificuldade em diferenciar episódios de relapso de infecções passadas. A resposta sorológica à infecção por *Brucella* é influenciada por diversos fatores como, o período de incubação da doença e fase clínica, sendo pouco útil para diagnóstico de relapso (Araj 2010; Center for Disease Control and Prevention 2017).

Recentemente métodos moleculares para o diagnóstico de BH vêm sendo descritos (Araj 2010; Center for Disease Control and Prevention 2017). A técnica de Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (qPCR) permite um diagnóstico rápido quando comparada à cultura e com alta sensibilidade e especificidade. Apesar disso, muitos métodos moleculares ainda necessitam de padronização quanto ao gene alvo, melhor amostra clínica e momento adequado de coleta para o exame (Center for Disease Control and Prevention 2017). Além disso, o processamento de amostras clínicas para qPCR não necessita de nível de biossegurança 3, sendo somente necessárias precauções básicas para processamento de amostras potencialmente infectantes e de laboratórios de biologia molecular. O avanço e padronização das técnicas moleculares também vêm permitindo o desenvolvimento de técnicas de tipagem e identificação de espécies diretamente da amostra clínica (Corbel 2006; Center for Disease Control and Prevention 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Em 2017, nosso grupo de trabalho recomendou testes laboratoriais para casos suspeitos de BH usando sorologia e testes moleculares (Tuon et al. 2017). O teste Rosa Bengala (aglutinação sérica) foi excluído devido à alta incidência de testes falsos positivos. No entanto, desde a implementação do teste de qPCR em soro, a porcentagem de testes positivos em pacientes com suspeita de BH tem sido baixa (<2% no geral, sendo até <0,5% em 2019). Nossa hipótese é que a sensibilidade dos *primers* e a matriz biológica utilizada (soro vs. sangue total) podem ser fatores associados à baixa sensibilidade do método. Portanto, o objetivo deste estudo foi padronizar, utilizando diferentes matrizes (soro versus sangue total) e genes alvo (IS*711* e *bcsp31*), um método de qPCR para o diagnóstico de BH específico, sensível e rápido, que possa contribuir de maneira efetiva para o diagnóstico de BH.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento e padronização analítica de teste de qPCR diretamente de amostras clínicas para diagnóstico laboratorial de casos de BH.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar a melhor sequência alvo e melhor amostra clínica (matriz) para pesquisa molecular de *Brucella* sp.;

b) Estudo comparativo de amostras clínicas pareadas (sangue total com EDTA e soro) em pacientes suspeitos de BH

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental para a padronização da pesquisa de BH por qPCR em amostras clínicas constou de três etapas. Na etapa 1, foi realizada a validação analítica da qPCR para a pesquisa de dois genes, IS*711* e *bcsp31*. Após determinação do melhor alvo, foi realizada a etapa 2 com o objetivo de avaliar a diferença entre as amostras clínicas sangue total e soro através de um estudo de contaminação *in vitro* com isolado bacteriano de *Brucella abortus*. Na etapa 3, foi realizada a pesquisa pareada com o alvo determinado na etapa 1 em amostras de sangue e soro de pacientes suspeitos de BH com o objetivo de determinar se os resultados obtidos na etapa 2 são relevantes para o diagnóstico clínico.

4.1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DA qPCR PARA OS GENES IS*711* E *BCSP31*

Controle Positivo para PCR. Foi utilizado o controle *AmpliRun DNA Control Brucella abortus* (Vircell Microbiologists, Granada, Granada, Espanha) preparado a partir da cepa S99 de *Brucella abortus*. O controle foi preparado de acordo com as instruções do fabricante contendo uma concentração final de 16.000 equivalentes genômicos (cópias de genoma completo - GE de *B. abortus* S99) por microlitro após reconstituição. A utilização deste controle não necessita de extração e foi utilizado diretamente na reação simulando um DNA extraído.

Pesquisa dos genes IS*711* e *bcsp31* por qPCR. Foram avaliados dois genes para pesquisa de *Brucella* sp.. O gene *bcsp31* é altamente conservado e presente em todas as espécies do gênero, mas está presente em uma única cópia no genoma das espécies de *Brucella* sp. (Sohrabi et al. 2014). A sequência publicada por Probert et al. tendo o gene *bcsp31* como alvo, e utilizada neste trabalho, é uma das sequências mais estudadas para pesquisa de *Brucella* sp. e, seu uso, como método de diagnóstico, já foi avaliado em diversos estudos (Sanjuan-Jimenez, Colmenero, and Morata 2017; Pablo Yagupsky, Morata, and Colmenero

2020; Probert et al. 2004). A sequência de inserção *711* (IS*711*) também está presente em todas as espécies do gênero de maneira conservada, mas o número de cópias é variável de acordo com a espécie e *biovar*, sendo geralmente encontradas de 5 – 8 cópias em *Brucella abortus* e *Brucella canis*, 7 – 10 cópias em *Brucella melitensis* e 6 – 13 *Brucella suis* (Bounaadja et al. 2009). Teoricamente, o maior número de cópias da IS*711* no genoma das espécies de *Brucella* pode apresentar uma vantagem em termos limite de detecção em relação ao gene *bcsp31*, diminuindo possíveis resultados falso-negativo e, aumentando a chance de amplificação quando há uma baixa carga bacteriana na amostra. Na análise do genoma completo da cepa de *Brucella abortus* S99 (Shome et al. 2014) (Referência: AWTU00000000.1 *Brucella abortus* S99) no software BioEdit (Versão 7.2.5) foram encontradas 5 cópias do gene IS*711* e 1 cópia do gene *bcsp31*. Para a pesquisa dos genes alvos foram utilizadas as seguintes sequências:

Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste estudo para qPCR

Alvo	***Forward* (5' – 3')**	***Reverse* (5' – 3')**	***Probe* (5' – 3')**	**Referência**
IS*711*	GCTTGAAGCTT GCGGACAGT	GGCCTACCGC TGCGAAT	FAM – AAGCCAACACCC GGCCATTATGGT	(Barkallah et al. 2014)
bcsp31	GCTCGGTTGCC AATATCAATGC	GGGTAAAGCG TCGCCAGAAG	FAM – AAATCTTCCACCTTG CCCTTGCCATCA	(Probert et al. 2004)

A mistura de reação foi preparada com 12,5µL de PCR Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos da América), 5,5 µL de água para PCR contendo uma concentração final de 300 nM para os *primers* e 200 nM para *probe* e 5µL de controle sintético de *Brucella abortus* S99 (Amplirun). A reação de PCR foi

realizada no equipamento 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos da América) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos por 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Para os dois alvos foram utilizados os mesmos parâmetros. As concentrações de *primers* e *probes* e os parâmetros de reação foram otimizados para melhor adequação as condições do laboratório. Não houve alteração nos resultados de Cq em relação as condições citadas com as condições determinadas pela referência. Desta maneira, optou-se pelas condições e concentrações adequadas à rotina do laboratório.

Curva Padrão. Para a realização da curva padrão foi realizada diluição seriada do controle sintético de *B. abortus* S99 resultando nas seguintes concentrações por reação: 10.000, 1.000, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 GE de *Brucella abortus* S99 por reação. Para o gene IS*711* estas diluições resultaram em 50.000, 5.000, 500, 100, 50, 25, 10 e 5 cópias do gene por reação enquanto, para o gene *bcsp31* resultaram em 10.000, 1.000, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 cópias do gene por reação. Para a determinação da curva padrão foram realizados 3 experimentos independentes em 6 replicatas, resultando em 18 pontos por diluição. As diluições foram realizadas antes de cada experimento. A curva padrão foi feita a partir da regressão linear de Cq x $\log_{10}$ da concentração do gene alvo por reação, baseada na determinação do número de cópias dos genes IS*711* e *bcsp31* na cepa S99 de *B. abortus*. Após a regressão linear dos pontos obtidos foram determinados o R^2 e a equação a reta ($y = mx + n$):

Cq = *slope* x log (n) + y-intercept, onde:

- **Cq** = Ciclo do threshhold
- ***slope* =** coeficiente angular da reta
- **log (n) =** logaritmo base 10 do número de cópias do gene por reação
- ***y-intercept* =** coeficiente linear da reta

4.1.1 PARÂMETROS AVALIADOS PARA VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS GENES IS*711* E *bcsp31*

Os parâmetros avaliados foram determinados de acordo com *Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods* (Broeders et al. 2014) , *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experimente* (Bustin et al. 2009) *e A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything* (Kralik and Ricchi 2017). Para ambos os genes foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) Especificidade

Foi calculada a especificidade *in silico* utilizando *o Basic Local Alignment Search Tool – BLAST* para cada *primers* e *probe* utilizando o sendo a busca realizada no *Standard databases – Nucleotide collection (nr/nt)* otimizado para *Highly similar sequences (megablast).* Foram avaliadas as sequências que continham alinhamento significativo. A especificidade da reação também foi avaliada *in vitro* utilizando DNA extraído de 42 cepas de não *Brucella* (Anexo 1) nas condições citadas anteriormente, incluindo bactérias do gênero *Ochrobactrum*, geneticamente relacionadas ao gênero *Brucella* e 5 cepas de *Brucella abortus*.

b) Valores Calculados a partir da Curva Padrão

Os seguintes valores foram calculados para cada gene a partir dos dados obtidos a partir da regressão linear da curva padrão:

Linearidade: Através da regressão linear da de Cq x log do número de cópias do gene alvo/reação realizada na curva padrão, foi determinado o R^2 da reta obtida, sendo este, o valor de Linearidade do método

Limite mínimo de detecção (LOD_6): Através da regressão linear de Cq x log do número de cópias do gene alvo/reação realizada na curva padrão foi considerado o LOD_6 a menor diluição onde houve amplificação nos 18 pontos.

Eficiência de amplificação: Através da determinação da equação da reta da curva padrão foi determinado o coeficiente angular (*slope*). A eficiência da reação foi determinada através da seguinte fórmula: **Eficiência = 10** $^{(-1/slope)}$

c) Limite mínimo de detecção ($LOD_{95\%}$)

Após a determinação da curva padrão, foi realizada a determinação do $LOD_{95\%}$ para cada um dos genes avaliados. Baseado nos resultados encontrados na Sensibilidade – LOD_6, foram testadas 60 replicatas da menor diluição em que houve amplificação nos 18 pontos e 60 replicatas de uma diluição acima e uma diluição abaixo. O $LOD_{95\%}$ foi considerado a diluição onde houve amplificação nas 60 replicatas testadas.

d) Precisão

A precisão do método foi determinada através da análise de variação intraensaio, avaliando a reprodutibilidade. Para esta análise, foi calculado o coeficiente de variação para cada diluição nos 3 experimentos independentes em 6 replicatas resultando em 18 pontos por diluição. Para a reprodutibilidade, as mesmas condições de método (parâmetros de PCR, concentração de *primers* e *probes*), equipamento e operador foram utilizados.

4.2 EXPERIMENTO DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*

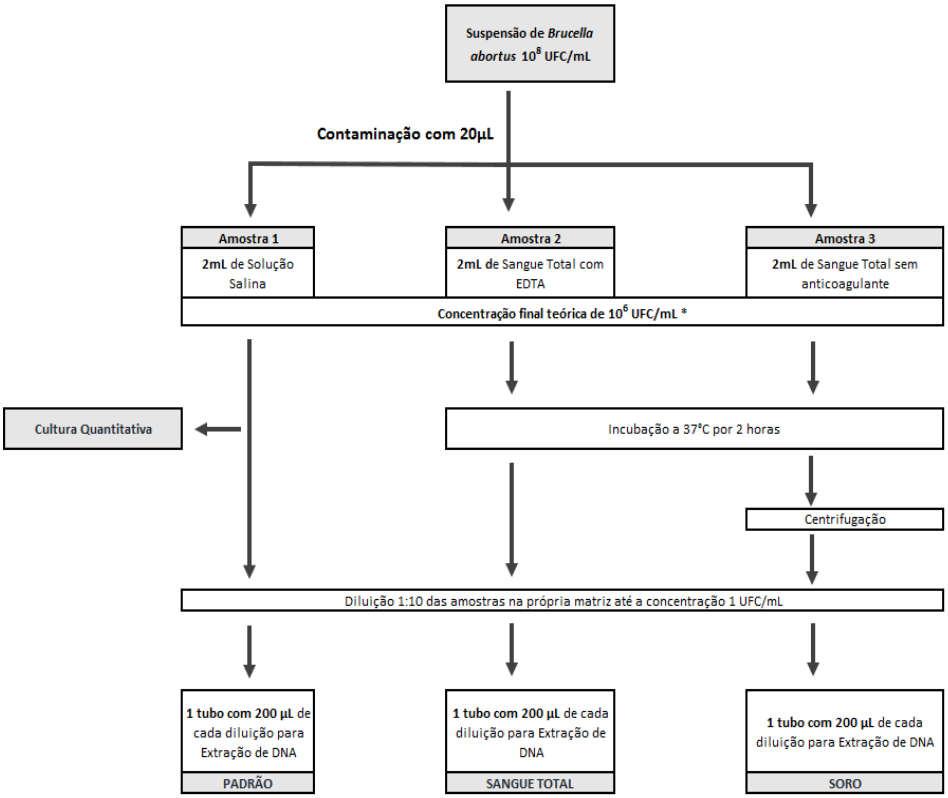
Para o estudo de contaminação *in* vitro, foram realizados dois experimentos independentes utilizando cepa da *Brucella abortus* isolada de hemocultura previamente identificada por MALDI-TOF (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de Voo) (Vitek MS, bioMerieux Marcy-l'Étoile, Auvergne-Rhône-Alpes, França) e por sequenciamento do gene 16S utilizando o kit MicroSEQ 500 16S rDNA kit (Applied

Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos da América). A cepa utilizada, armazenada congelada a -80°C e reativada a partir do banco de cepas do LACEN/PR, foi inoculada em ágar chocolate e incubada em tensão de CO_2 a 37°C por dois dias. Para cada experimento foram obtidas amostras de sangue de doador saudável e sem evidência sorológica de infecção prévia por *Brucella* sp. (sorologia por ELISA para IgM e IgG não reagente). Após a coleta de sangue, 2 mL foram transferidos para dois tubos de EDTA para obtenção de sangue total e 2 mL para dois tubos com gel separador.

A contaminação foi realizada preparando uma suspensão da cepa de *B. abortus* descrita anteriormente com uma concentração 0,5 da Escala de McFarland, equivalente a 10^8 UFC/mL. Desta suspensão, as amostras de sangue total com EDTA (Amostra 2) e sangue total sem EDTA (Amostra 3) foram contaminadas com 20µL da suspensão de *B. abortus* a fim de se obter uma concentração teórica de 10^6 UFC/mL. Paralelamente, foi contaminado um tubo contendo 2 mL de solução salina estéril (Amostra 1), da mesma maneira realizada com as amostras de sangue. Desta suspensão de salina estéril, foi realizada cultura quantitativa a fim de obter o número de UFC/mL da suspensão bacteriana original. As amostras de sangue contaminadas foram incubadas por 2 horas a 37°C. As amostras de sangue em tubo de gel separador, após retração do coágulo, foram centrifugadas a fim de obter o soro. Após este período as amostras foram diluídas na própria matriz para as seguintes concentrações teóricas: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 e 1 UFC/mL. A amostra de salina contaminada também foi diluída igualmente conforme realizado com as amostras de sangue. O fluxo de contaminação está apresentado na Imagem 1. Os experimentos de contaminação foram realizados em duplicata. Para as amostras de sangue total e soro, foi utilizada a amplificação do gene humano endógeno *RNaseP* em uma outra reação de qPCR como padrão interno para verificação da extração e possível carreamento de inibidores. Para todas as amostras extraídas, obrigatoriamente deve haver amplificação do gene *RNaseP*. O gene

utilizado para pesquisa de *Brucella* sp. nas amostras contaminadas in vitro foi o gene IS*711*, pois apresentou o melhor desempenho na etapa 4.1 - Parâmetros avaliados para Validação Analítica dos genes IS*711* e *bcsp31*. A diferença entre sangue total, soro e solução salina foi avaliada através de ANOVA entre os Cq obtidos para cada diluição e através de regressão probabilística para cada matriz avaliada.

Figura 1 – Fluxograma de contaminação in vitro



** A contagem final em UFC/mL cada tubo será corrigida a partir dos resultados da cultura quantitativa*

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras foram obtidas através da coleta de pacientes já incluídos no Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância em Saúde para Brucelose Humana no Estado do Paraná (2ª Edição). O critério de inclusão nesta etapa foi suspeita clínica de Brucelose de acordo com a seguinte definição de caso: "Febre mais um ou mais sinais e sintomas: suores noturnos,

artralgia, cefaleia, mialgia, anorexia, fadiga", com ligação epidemiológica com produto ou animal suspeito para brucelose e coleta pareada de sangue total e soro. Não foram incluídos pacientes com vínculo epidemiológico ou acidente vacinal, mas assintomáticos no momento da coleta da amostra. Os parâmetros de amplificação por qPCR foram realizados conforme descrito anteriormente nas etapas 1 e 2. O material genético foi extraído conforme descrito no item 4.4 Pacientes com suspeita de BH pela primeira vez, bem como pacientes com recidiva, e aqueles com exposição prévia a *Brucella* (resultados de ELISA positivos para IgM e IgG contra *Brucella*) estavam qualificados para participar do estudo. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da PUCPR (nº 84644718.3.0000.0020)

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Para todas as etapas onde foi realizada extração de DNA foi utilizado o equipamento de extração automatizado MagNAPure 96 (Roche Molecular Biochemicals Indianapolis, Indiana, Estados Unidos da América). 200 µL foram utilizados para extração de DNA genômico de acordo com o protocolo para cada tipo de amostra com um volume de eluição final de 100 µL. A extração de ácidos nucleicos foi realizada com o kit *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit.* Com o uso deste kit, todos os reagentes necessários para extração e purificação dos ácidos nucleicos já estão prontos para uso e, todas as transferências de reagentes/amostras são realizadas de maneira automatizada, garantindo assim, uma melhor reprodutibilidade no processo de extração de DNA.

4.5 ANALÍSES ESTATÍTICAS

Todas as análises estatísticas empregadas nesse trabalho, como as regressões das curvas padrões, ANOVA e regressão probabilística foram realizadas no software IBM SPSS Statitics (IBM, Versão 27) e os gráficos, no software Microsoft Excel (Microsoft, Office 365).

5. RESULTADOS

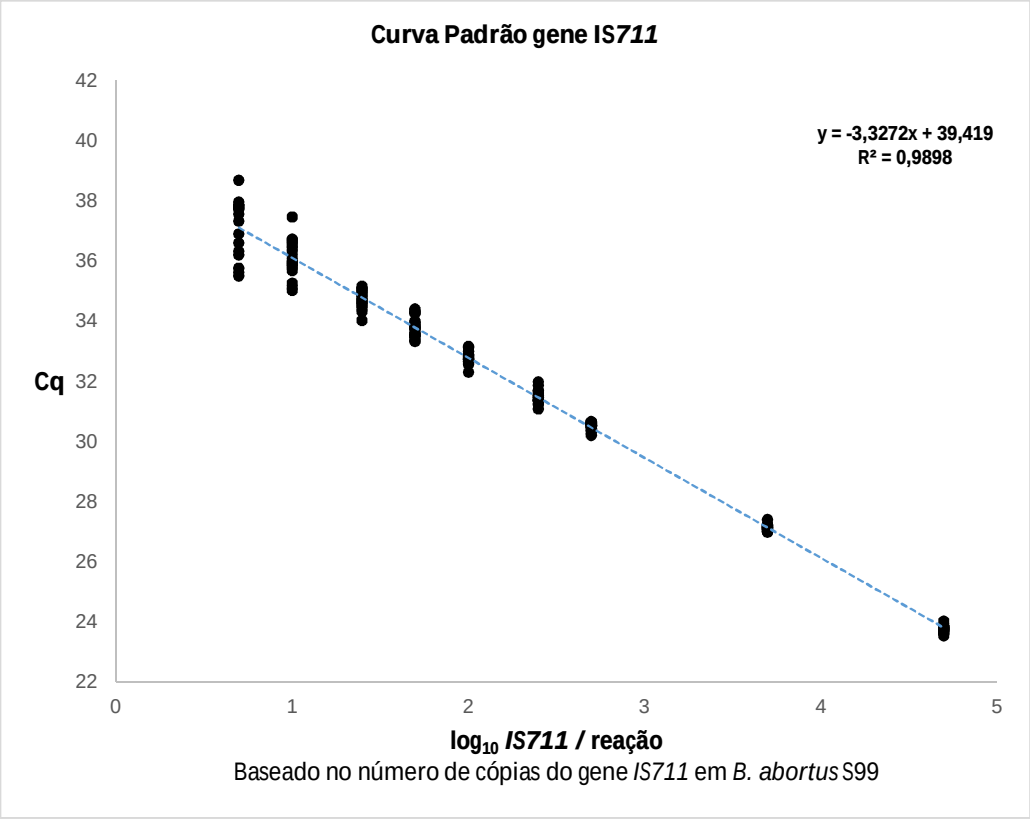
5.1 ETAPA 1 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA

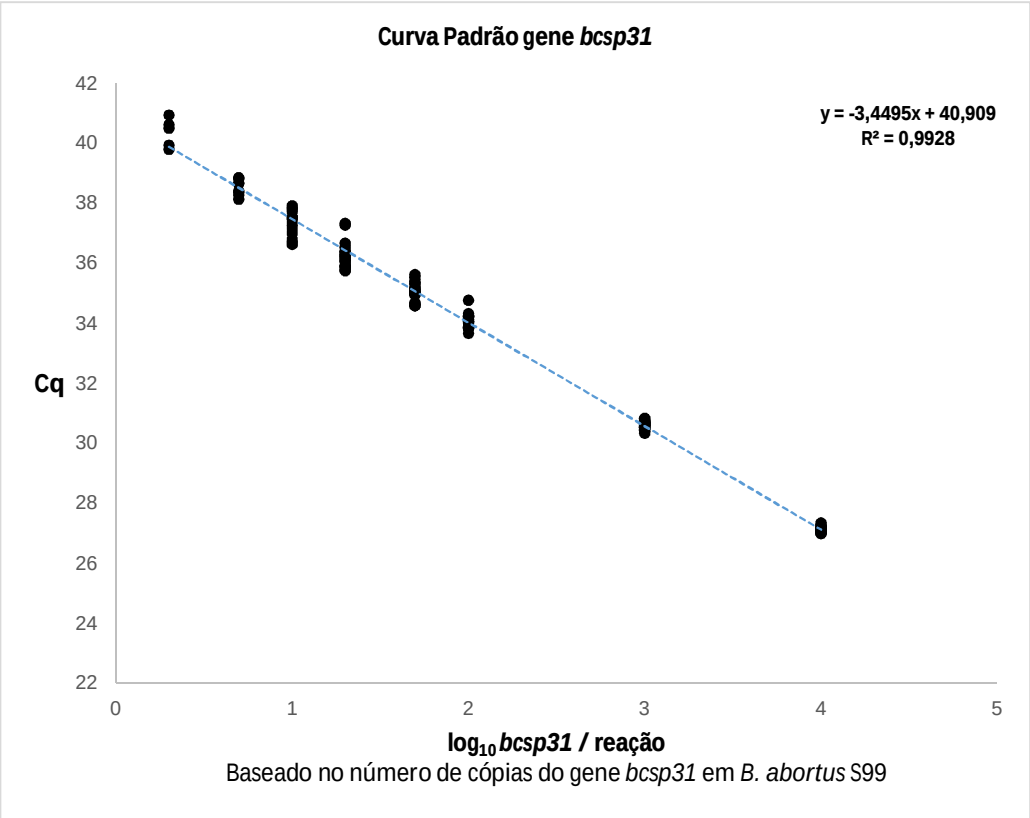
Especificidade: No alinhamento *in silico* realizado no BLASTn, houve apenas alinhamento significativo com a espécies de *Brucella* para o conjunto de *primers* e *probe*, para os genes IS*711* e *bcsp31*. Para análise *in vitro*, houve amplificação com os 5 isolados de *B. abortus* testados e não houve amplificação com nenhum dos 42 isolados de cepas não *Brucella*, (Anexo 1)

Curva Padrão: Para cada gene, a curva padrão foi baseada no número de cópias por reação determinada de acordo com o genoma completo da cepa de referência AWTU00000000.1 *Brucella abortus* S99. Os gráficos obtidos com a regressão linear para ambos os genes e sua equação linear são apresentados na Figura 2. Os valores dos parâmetros calculados a partir da curva padrão, linearidade, *slope*, eficiência e sensibilidade (LOD_6) são apresentados na tabela 3. Para LOD_6, não há valor específico que seja aceitável, mas idealmente deve ser inferior a 20 cópias por reação, para garantir a aplicabilidade do método. Desta forma, de acordo com a distribuição Poisson, espera-se que o limite inferior de detecção de qPCR seja de 3 cópias por reação. Mesmo que seja um valor hipotético, o LOD deve ser um valor próximo a 3 cópias e um valor aplicável para detecção da região alvo. Para os genes avaliados o LOD_6 foi considerado aceitável, sendo 10 cópias por reação para IS*711* (igual a 2 GE de *Brucella abortus* S99) e 20 cópias por reação para *bscp31* (igual a 20 GE de *Brucella* abortus S99). A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação na regressão linear plotando Cq x $\log_{10}$ de cópias do gene por reação. A linearidade deve cobrir, pelo menos, uma diluição de 6 vezes para cada gene testado. Em nosso estudo, foram utilizadas 9 diluições para cada gene, variando de 10.000 cópias até 1 cópia por reação de *Brucella abortus* S99. Os valores de linearidade devem ser maiores que 0,98 quando testados em pelo menos 6 diluições. Para a linearidade, os valores foram aceitáveis para os dois genes

avaliados. O *slope* da regressão linear foi usado para calcular a eficiência de amplificação da PCR (E). Quando a eficiência do PCR é igual a um (ou 100%) significa que a cada ciclo de PCR o número de cópias de DNA é duplicado. Na prática, a eficiência deve estar na faixa de 80 a 120% (ou *slope* entre -3,9 a -2,9) para qPCR qualitativos. A eficiência foi de 99,71% e 94,92% para IS*711* e *bcsp31*, respetivamente. A análise intraensaio do teste foi baseada nos valores do coeficiente de variação (CV) para cada ponto de diluição para ambos os genes. Não há um valor considerado aceitável para CV entre as repetições, mas em consenso para qPCR, espera-se que o CV entre as repetições seja inferior a 25%. Para cada diluição para ambos os genes, todos os CV ficaram abaixo de 25%. Os resultados de qPCR da Etapa 1 estão disponíveis no Apêndice 2.

Figura 2 – Curva Padrão para os Genes IS*711* e *bcsp31*





Limite de detecção ($LOD_{95\%}$): Com base nos resultados encontrados na sensibilidade (LOD_6), 60 repetições das diluições 25, 10 e 5 para o gene IS*711* e 50, 20, 10 diluições do gene *bcsp31* foram testadas. A detecção percentual do gene IS*711* foi de 100% (CI95% 94–100) para 25 e 10 cópias, mas apenas 71% (CI95% 59–83) para 5 cópias. A detecção percentual do gene *bcsp31* foi de 100% (CI95% 94–100) para 50 e 20 cópias, mas apenas 78% (CI95% 66–88) para 10 cópias (tabela 4).

Tabela 4 - Valores aceitáveis para padronização analítica

Parâmetro	**Valores Aceitáveis (Broeders et al. 2014)**	**IS*711***	***bcsp31***
Linearidade	>= 0,98	0,990	0,995
LOD_6	<=20 GE / reação	10 cópias / reação	20 cópias / reação

Eficiência	80 – 120%	99,71%	94,92%
Especificidade	Sem amplificação falso positivo ou negativo	Sem amplificação falso positivo ou negativo	Sem amplificação falso positivo ou negativo
Precisão (IntraEnsaio)	CV <=25%	Todas as diluições com CV < 25%	Todas as diluições com CV < 25%

LOD, Limite de Detecção; GE. Equivalentes Genômicos; CV, Coeficiente de Variação.

Tabela 5 – Resultados da determinação do $LOD_{95\%}$

$LOD_{95\%}$ para o gene IS*711*				
Cópias Gene / reação	**Testadas**	**Detectadas**	**% Detecção**	**IC 95%**
25	60	60	100%	94,04% - 100%
10	60	60	100%	94,04% - 100%
5	60	43	71,67%	58,56% - 82,55%
$LOD_{95\%}$ para o gene *bcsp31*				
Cópias Gene / reação	**Testadas**	**Detectadas**	**% Detecção**	**IC 95%**
50	60	60	100%	94,04% - 100%
20	60	60	100%	94,04% - 100%
10	60	47	78,33%	65,80% - 87,93%
IC95% = Intervalo de Confiança 95%				

5.2 ETAPA 2 – ESTUDO DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*

Para qPCR de amostras contaminadas foi selecionado o gene que apresentou os melhores resultados na validação analítica. Desta forma, o gene IS*711* foi usado para esta etapa. Os resultados quantitativos da cultura determinaram a concentração em 750.000 UFC/mL de *B. abortus*, em contraste com o esperado de 1.000.000 UFC/mL, equivalente de 0,5 do padrão de McFarland. A curva padrão (figura 3) das amostras contaminadas foi realizada através da regressão linear de Cq x $\log_{10}$ de 750.000 UFC/mL e suas consequentes diluições 1:10 (8 no total), obtendo a seguinte equação linear para solução salina, sangue

total e soro respetivamente: Cq = - 3,3217 (log_{10} UFC/mL) + 43,705; Cq = - 3,3525 (log_{10} UFC/mL) + 44,084; Cq = - 3,2349 (log_{10} UFC/mL) + 47,385. A eficiência de amplificação e linearidade foi de 98,72% e 0,990 para sangue total; 104,15% e 0,988 para soro e 100,04% e 0,989 para solução salina. Os resultados da média, CI95% e DP para Cq e percentagem de detecção de 8 pontos por diluição são apresentados no Anexo 3. Para concentrações 750.000, 75.000, e 7.500 UFC/mL todas as amostras foram detectáveis para as 8 replicatas. Na concentração 750, as 8 replicatas foram detectadas para sangue total e solução salina e 5 (62,5%) para soro. Na concentração de 75 UFC/mL, 7 (87,5%) foram detectáveis para a solução salina; 6 (75%) para sangue total e apenas 1 (12,5%) para soro. Em 7,5 UFC/mL, 1 (12,5%) replicata foi detectável para sangue total, 3 (37,5%) para solução salina e nenhuma para o soro. Encontramos diferença significativa entre o Cq de todas as diluições para sangue total x soro e para solução salina x soro. ($p < 0,001$). Não foi encontrada diferença significativa entre sangue total e solução salina. Para estimar o $LOD_{95\%}$ das amostras contaminadas, foi realizada a regressão probabilística plotando o valor dos probits (com base em % de detecção) x log_{10} UFC/mL. O $LOD_{95\%}$ foi estimado em 224 UFC/mL para sangue total, 3.681 UFC/mL para soro e 146 UFC/mL para solução salina (figura 4).

Tabela 6 – Parâmetros determinados a partir dos resultados da Curva Padrão

Parâmetros Avaliados	Sangue Total	Soro	Solução
Linearidade	0,990	0,988	0,989
slope	-3,353	-3,235	-3,322
Eficiência de amplificação	98,72%	104,15%	100,04%
Fator de amplificação	1,99	2,04	2,00

Figura 3 – Curva Padrão para Amostras Contaminadas – Sangue Total, Soro e Solução Salina

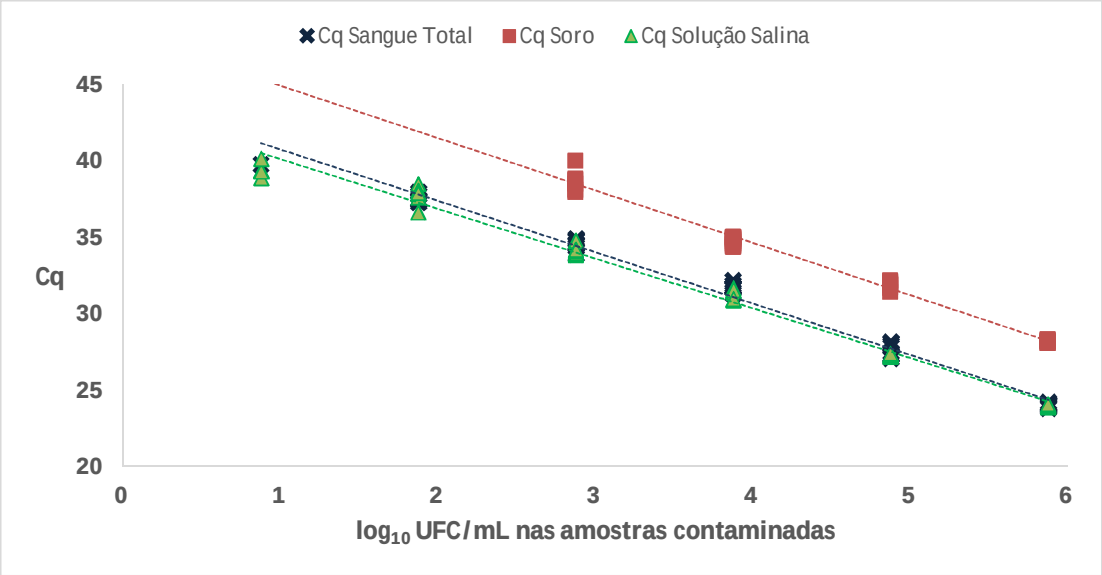


Figura 4 – $LOD_{95\%}$ estimado após Regressão Probabilística – Sangue Total, Soro e Solução Salina

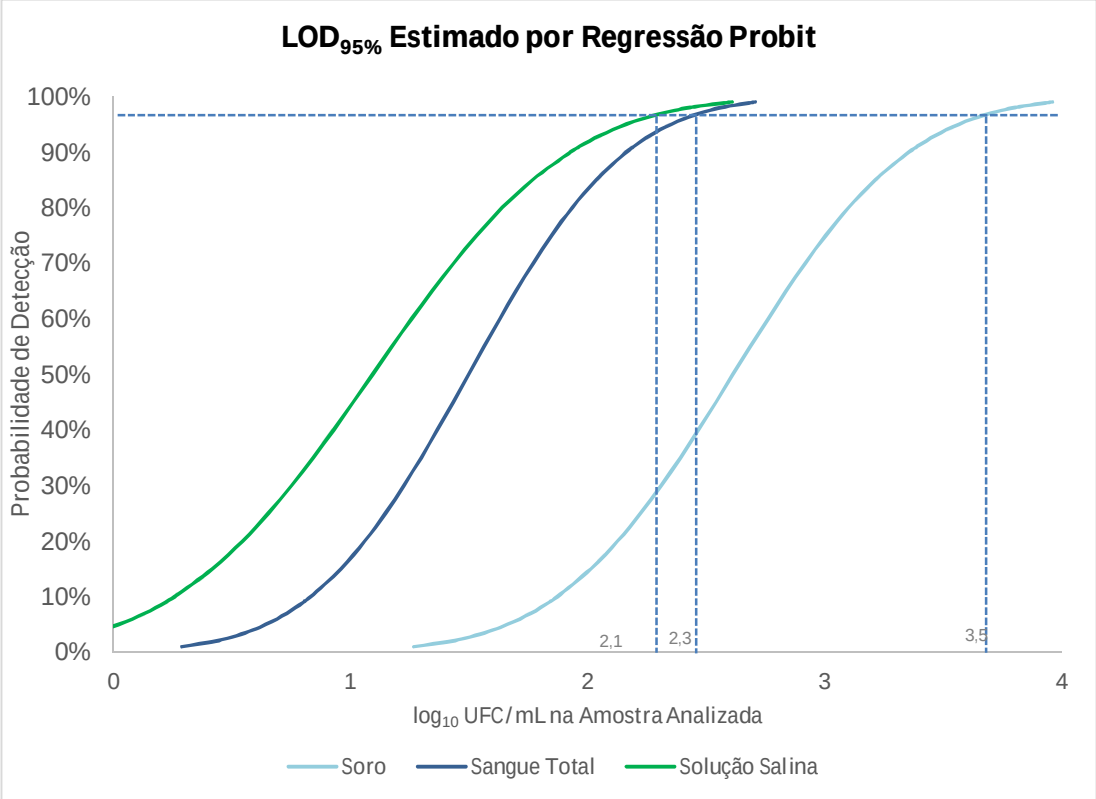


Tabela 7 – $LOD_{95\%}$ estimado após Regressão Probabilística em UFC/mL

Amostra Contaminada	$LOD_{95\%}$ Estimado em log_{10} UFC/mL	$LOD_{95\%}$ Estimado em UFC/mL
Sangue Total	2,352	224
Soro	3,566	3681
Solução Salina	2,164	146

5.3 ETAPA 3 – VALIDAÇÃO CLÍNICA DO qPCR

Foram incluídas amostras pareadas de sangue total e soro de 12 pacientes com suspeita de BH. Todos os pacientes que participaram da fase 3 eram suspeitos de BH pela primeira vez. Não houve nenhum paciente onde a suspeita era recidiva ou relapso da doença. O período médio (dias) entre o início dos sintomas e a coleta da amostra foi de 16 dias, sendo que em 58,3% dos pacientes esse período foi superior a 2 semanas e em 25% foi superior a 4 semanas. A amostra de um paciente testou positiva para IgM, mas foi não detectável no qPCR em sangue total e em soro utilizando o método qPCR após a otimização nas Etapas 1 e 2. Dos 12 pacientes avaliados, houve amplificação em 1 amostra (8,3%) de sangue total. Nenhuma das amostras de soro foi detectável para *Brucella* (tabela 6). Todas as reações qPCR foram realizadas em duplicata. No caso da amostra de sangue total positiva ambas as duplicatas da reação foram detectadas, com uma média de Cq de 37. Neste caso, tanto IgM quanto IgG foram detectáveis. Para todos os pacientes testados, em todas as amostras de sangue total e soro houve, amplificação do controle interno *RNaseP*. Os resultados encontrados na etapa estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultado da validação clínica do qPCR

Paciente	Tempo início dos sintomas e coleta (dias)	qPCR Sangue Total	qPCR Soro	IgM ELISA	IgG ELISA	Gênero	Idade (anos)	Área	Estado de Residência
1	6	ND	ND	NR	NR	M	47	Rural	PR
2	11	ND	ND	NR	NR	M	49	Urbana	PR
3	19	ND	ND	NR	NR	M	32	Urbana	MG
4	36	ND	ND	NR	NR	F	50	Rural	PR
5	23	ND	ND	NR	NR	M	20	Rural	PR
6	7	DET	ND	REG	REG	M	25	Urbana	MG
7	7	ND	ND	NR	NR	M	44	Urbana	PR
8	30	ND	ND	NR	NR	F	33	Rural	PR
9	11	ND	ND	NR	NR	F	9	Rural	PR
10	15	ND	ND	NR	NR	M	48	Urbana	PR
11	2	ND	ND	NR	NR	M	53	Rural	PR
12	30	ND	ND	REG	NR	M	25	Urbana	PR

DET = Detectável; ND = Não Detectável; REG=Reagente, NR = Não Reagente; M = Masculino; F = Feminino

6. DISCUSSÃO

Sequência IS*711* está presente em todas as espécies do gênero *Brucella*, mas o número de cópias do gene varia de acordo com a espécie e até mesmo entre *biovares*, geralmente estando presente em 5–8 cópias em *Brucella abortus* e *Brucella canis*, 7–10 cópias em *Brucella melitensis*, e 6–13 em *Brucella suis*, sendo estas a principais espécies associadas a infecções em humanos (Bounaadja et al. 2009). O gene *bcsp31* também é altamente conservado e está presente em todas as espécies deste gênero, mas apenas uma única cópia do gene está presente no genoma de *Brucella* spp. (Sohrabi et al. 2014). Diversos protocolos utilizando estes genes como alvo já foram descritos (Bounaadja et al. 2009; Sohrabi et al. 2014; Moulana, Hasanjani Roushan, and Marashi 2016; Hull and Schumaker 2018; Probert et al. 2004), com resultados para especificidade e sensibilidade divergentes entre si, sendo que alguns protocolos mostraram o gene IS*711* com melhor sensibilidade (Al Dahouk et al. 2007; Bounaadja et al. 2009). Hipoteticamente, a melhor sensibilidade do gene IS*711* pode desempenhar um papel importante na detecção de *Brucella* por qPCR devido ao maior número de cópias do gene por célula, e teoricamente, o uso de IS*711* como gene alvo é mais sensível do que *bcsp31* (Pablo Yagupsky, Morata, and Colmenero 2020). Os resultados da padronização analítica deste estudo confirmam esta hipótese, pois o gene IS*711* apresentou tanto um LOD_6 quanto um $LOD_{95\%}$ inferior em comparação com *bcsp31*. Esta maior sensibilidade também foi avaliada em outro estudo usando qPCR para identificação de cepas de *Brucella*; Bounaadja et. al. também encontraram melhor sensibilidade para o gene IS*711* em comparação ao gene *bcsp31*, com uma diferença no Cq de 0,41 a 5,21 para diferentes cepas de *Brucella* (Bounaadja et al. 2009). Em nossos resultados, obtivemos uma diferença entre os Cq de aproximadamente 3 a 4 no controle sintético, sendo essa uma diferença que pode contribuir para um melhor diagnóstico clínico. Em relação a especificidade, alguns primers para de detecção o gene *bcsp31* apresentam amplificação inespecífica para espécie

intimamente relacionada a *Brucella*, *Ochrobactrum anthropi*, (Probert et al. 2004). No entanto, no presente estudo, nenhuma amplificação foi observada em *O. anthropi* e *O. intermedium* com os *primers* desenhados para *bcsp31* e IS*711*. A análise dos resultados da validação mostrou que todos os parâmetros analíticos estão dentro dos limites aceitáveis, sendo assim, ambos os genes, IS*711* e *bcsp31*, podem ser usados para detecção de *Brucella* baseada em qPCR. No entanto, IS*711* foi escolhido para a fase 2 deste estudo pois teve um melhor desempenho analítico.

Muitas matrizes diferentes incluindo soro, sangue total, *buffy coat*, plasma e biópsias de tecido foram testados para a detecção de *Brucella* por qPCR. No entanto, até onde sabemos, não há consenso sobre qual matriz é mais adequada para esta aplicação. De acordo com o Guia de Referência da Brucelose (Exposições, Testes e Prevenção) publicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Center for Disease Control and Prevention 2017) o melhor tipo de matriz para a detecção por PCR não está bem definida. Quando a fisiopatologia da BH é avaliada, o tipo de matriz mais adequado para detecção de *Brucella* é melhor compreendido. As espécies de *Brucella* mostram um alto tropismo para tecidos específicos, geralmente concentrando-se no sistema fagocitário mononuclear, incluindo os gânglios linfáticos e baço (Corbel and Moriyón 2006; Olsen and Palmer 2014). A bacteremia por *Brucella* geralmente se apresenta como uma carga baixa bacteriana (P. Yagupsky 1999), e mesmo quando métodos moleculares são utilizados, o que inclui a detecção de células bacterianas não viáveis ou mortas ou lisadas, a carga de DNA de *Brucella* no sangue permanece baixa (Opota, Jaton, and Greub 2015). A baixa carga de DNA de *Brucella* no sangue pode ser ainda mais problemática considerando as diferentes fases da brucelose, por exemplo, casos crônicos ou focais, onde a bacteremia pode ser muito baixa (Mitka et al. 2007). As amostras de tecido podem ser uma opção para a detecção de *Brucella*, mas geralmente essas amostras são mais difíceis de obter e geralmente requerem um pré-

tratamento antes da extração de DNA (Zhang et al. 2019). Portanto, as amostras de sangue periférico seriam uma opção melhor para a detecção de *Brucella* por qPCR. Em um estudo que determinou cargas bacterianas em pacientes com diagnóstico prévio de brucelose, Navarro et. al. descreveram que a carga de DNA de *Brucella melitensis* em amostras de sangue total variou de 7–4982 cópias por mL (Navarro et al. 2006). A carga de DNA de *Brucella* no sangue total é significativamente menor em pacientes com diagnóstico prévio de brucelose que não receberam tratamento antimicrobiano em comparação com o observado em outras causas de infecção da corrente sanguínea e, pode ainda, ser inferior ao limite de detecção, mesmo quando se usa métodos de detecção molecular altamente sensíveis (Bacconi et al. 2014; Opota, Jaton, and Greub 2015). Teoricamente, o soro seria uma escolha melhor para uso de métodos moleculares, uma vez que não contém anticoagulantes e uma concentração mais baixa de inibidores de PCR; no entanto, no diagnóstico de BH, o uso de soro pode resultar em baixas concentrações de células e /ou DNA de *Brucella* (Sanjuan-Jimenez, Colmenero, and Morata 2017).

Zerva et al. descreveram o soro como amostra biológica mais adequada que o sangue total para detecção de *Brucella* por PCR, obtendo uma sensibilidade do ensaio em amostras de soro (94%) maior do que a do sangue total (61%) (Zerva et al. 2001). Além disso, Zerva et. al. observaram que o sangue total continha alguns inibidores de PCR influenciado na detecção (Zerva et al. 2001); Entretanto, em nosso estudo, a inibição da PCR não foi observada durante a análise de eficiência, de curvas padrão ou amplificação de *RNaseP*. Em contraste, Mitka et. al. determinaram que sangue total e *buffy coat* eram as melhores matrizes para detecção de BH por PCR e notaram que o soro não era uma boa matriz para o acompanhamento pós-tratamento (Mitka et al. 2007). Outro estudo mostrou que em 17 pacientes positivos para cultura de *Brucella* apenas 11 produziram detecção de PCR positiva em amostras de soro utilizando *bcsp31* como gene alvo (sensibilidade do ensaio de 64,7%)

(Debeaumont, Falconnet, and Maurin 2005). Portanto, na literatura, existem algumas diferenças em relação à amostra ideal para o diagnóstico de BH por PCR. Desta maneira, realizamos o estudo de contaminação *in vitro*. A principal diferença entre as matrizes contaminadas foi o limite mínimo de detecção para a regressão probit. No sangue total contaminado detectamos aproximadamente 224 UFC/mL, enquanto no soro detectamos 3.684 UFC/mL na estimativa de 95% LOD após a regressão probit. Se basearmos nossa análise na faixa esperada de cópias do gene de *Brucella* por mL de acordo com Navarro et. al. (Navarro et al. 2006) a detecção no soro pode ser problemática, pois em alguns casos a carga bacteriana pode estar abaixo do limite de detecção. A análise ANOVA dos Cq também mostrou uma diferença significativa entre soro e do sangue total

Comparando os resultados da ANOVA de sangue total e soro com o da solução salina foi observada diferença significativa entre o soro e a solução salina, enquanto nenhuma diferença foi encontrada entre o sangue total e a solução salina, mostrando que todo o inóculo bacteriano (concentração contaminada) pôde ser detectado no sangue total, mas não no soro. Valores mais baixos de Cq no sangue total podem ser atribuídos à característica intracelular de *Brucella*; na análise de sangue total todo o DNA de *Brucella*, mesmo dentro dos leucócitos é detectável, enquanto no soro apenas lisado de *Brucella* ou células extracelulares estariam presentes após a centrifugação e, portanto, detectáveis.

Em alguns casos, a extração de DNA de sangue total pode ser problemática devido ao transporte de inibidores, mas isso não contra indica totalmente o uso desta matriz em PCR (Al-Soud and Rådström 2001; Opota, Jaton, and Greub 2015), e esta limitação pode ser facilmente evitada com procedimentos padronizados na coleta, transporte e extração de DNA destas amostras (Al-Soud and Rådström 2001; Tan and Yiap 2009). Todos os outros parâmetros avaliados foram aceitáveis para sangue total e soro, mostrando que não há outra diferença entre essas duas matrizes além do limite mínimo de detecção (conforme discutido).

Portanto, soro e sangue total podem ser usados para detecção de *Brucella* por qPCR; no entanto, em alguns casos, o soro pode dar resultados falsos negativos devido à baixa carga de *Brucella* na corrente sanguínea.

As diferenças no desempenho analítico entre soro e sangue total observada nas amostras contaminadas também foram avaliadas em amostras clínicas de pacientes com suspeita de BH, a fim de determinar se essas diferenças poderiam afetar o diagnóstico laboratorial de BH por PCR. Na análise de amostras de 12 pacientes clínicos com suspeita de BH, a detecção de qPCR usando sangue total melhorou o diagnóstico em um caso. Para esta amostra positiva, ambas as replicatas foram positivas, embora com altos valores de Cq (média de 37), o que pode ser atribuído à baixa carga de DNA de *Brucella* na corrente sanguínea.

Após a implementação de qPCR no soro em nosso laboratório em 2016, o percentual de testes positivos de pacientes com suspeita de BH tem sido baixo, com apenas 1,97% (26/1318) das amostras positivas. No período 2016-2019, apenas 22 amostras foram positivas para BH em 2016 (n = 366), com duas amostras positivas em 2017 (n = 330), uma em 2018 (n = 317) e uma em 2019 (n = 305). No mesmo período, o percentual de amostras positivas analisadas por método sorológico (IgM reagente por ELISA conforme critérios de identificação laboratorial preconizado pelo protocolo do Estado do Paraná para BH) (Tuon et al. 2017)) foi de 10,01% (127/1227), apresentando quase a mesma taxa ano a ano. Quando analisamos os resultados de amostras clínicas de sangue total, mesmo com apenas uma amostra positiva em 12 pacientes, isso leva a um possível aumento no diagnóstico de BH por qPCR. Mas, este apenas um caso positivo em qPCR em sangue total poderia melhorar os casos de BH confirmados em laboratório se considerássemos todas as amostras processadas.

Nossos resultados mostraram que o sangue total é melhor do que o soro para a detecção do DNA de *Brucella*, uma questão importante para melhorar o diagnóstico de BH. Possíveis

problemas encontrados com sangue total para qPCR podem ser facilmente resolvidos com protocolos padronizados (Tan and Yiap 2009). Os dados da análise de amostras contaminadas *in vitro* mostraram que, em comparação com o soro, o sangue total contém uma carga de DNA de *Brucella* maior e isso pode melhorar o diagnóstico por qPCR.

Um dos grandes desafios no diagnóstico de BH é o tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra, que na maioria dos casos é de mais de 2 semanas, momento em que a carga de *Brucella* na corrente sanguínea pode estar muito baixa ou ausente. Na fase 3 deste estudo, o tempo médio entre a coleta da amostra e o início dos sintomas foi de 16 dias; superior a duas semanas em 58,3% dos pacientes e mais de quatro semanas em 25% dos pacientes. Este tempo prolongado pode afetar a sensibilidade qPCR, no entanto, quando a carga de DNA de *Brucella* é baixa, o uso de sangue total pode minimizar esta diminuição associada na sensibilidade (Hull and Schumaker 2018).

7. CONCLUSÃO

O método de qPCR utilizando o gene IS*711* como alvo demonstrou ser uma ferramenta útil para o diagnóstico de BH em pacientes suspeitos, com o potencial de ser aplicado clinicamente, apresentando um limite mínimo de detecção menor que o gene *bcsp31* (10 x 20 cópias por reação). O sangue total mostrou ser uma amostra clínica mais adequada para o diagnóstico laboratorial no ensaio de contaminação *in vitro,* apresentando um limite de detecção menor que o soro, com uma diferença significativa entre os resultados de Cq, mostrando uma possível carga bacteriana maior em amostras de sangue total. Este efeito também pode ser observado na coleta de amostra clínica pareada, onde das 12 coletas, 1 amostra de sangue total apresentou resultado detectável e nenhuma amostra de soro foi detectável. Além disso, nenhum um tipo de inibição de PCR foi observado nas amostras de sangue total. O soro não é uma amostra clínica totalmente contraindicada para os métodos moleculares, mas é uma amostra mais susceptível a resultados falso-negativos.

A maior limitação deste estudo foi a impossibilidade de obtenção e realização de hemocultura, método padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de BH. Desta maneira, não foi possível avaliar se algum dos resultados obtidos são falso-positivo ou falso-negativo, e consequentemente, avaliar a especificidade e sensibilidade dos métodos utilizados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho ainda está em andamento e pretendemos ser capazes de detectar *B. abortus* e *B. melitensis*, as principais causas da BH, diretamente em amostras clínicas, e esperamos que uma maior carga de DNA no sangue total possa permitir a identificação direta de espécies em amostras clínicas, assim como identificação do gênero.

O artigo científico resultante deste trabalho foi submetido para a revista Journal of Microbiological Methods em dezembro de 2020 e publicado no dia 27 de fevereiro de 2021 com o título "*Comparative study of IS711 and bcsp31-based polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of human brucellosis in whole blood and serum samples*" com o DOI 10.1016/j.mimet.2021.106182.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, Pedro N., and Boris Szyfres. 2005. “Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre.” *Revista Española de Salud Pública* 79 (3): 423–423. https://doi.org/10.1590/s1135-57272005000300012.

Aires, Danielle Muniz Pessoa, Karyne Oliveira Coelho, and Osvaldo José Silveira Neto. 2018. “Brucelose Bovina: Aspectos Gerais e Contexto Nos Programas Oficiais de Controle.” *Revista Científica de Medicina Veterinária* 30: 1–16.

Al-Soud, W A, and P Rådström. 2001. “Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells.” *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2): 485–93. https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001.

Araj, George F. 2010. “Update on Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (SUPPL. 1): S12–17. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.014.

Ariza, Javier, Mile Bosilkovski, Antonio Cascio, Juan D. Colmenero, Michael J. Corbel, Matthew E. Falagas, Ziad A. Memish, et al. 2007. “Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations.” *PLoS Medicine* 4 (12): 1872–78. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040317.

Bacconi, Andrea, Gregory S. Richmond, Michelle A. Baroldi, Thomas G. Laffler, Lawrence B. Blyn, Heather E. Carolan, Mark R. Frinder, et al. 2014. “Improved Sensitivity for Molecular Detection of Bacterial and Candida Infections in Blood.” *Journal of Clinical Microbiology* 52 (9): 3164–74. https://doi.org/10.1128/JCM.00801-14.

Banai, Menachem, and Michael Corbel. 2014. “Taxonomy of Brucella.” *The Open Veterinary Science Journal* 4 (1): 85–101. https://doi.org/10.2174/1874318801004010085.

Barkallah, Mohamed, Yaakoub Gharbi, Amal Ben Hassena, Ahlem Ben Slima, Zouhir

Mallek, Michel Gautier, Gilbert Greub, Radhouane Gdoura, and Imen Fendri. 2014. "Survey of Infectious Etiologies of Bovine Abortion during Mid- to Late Gestation in Dairy Herds." *PLoS ONE* 9 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091549.

Bounaadja, Lotfi, David Albert, Benoît Chénais, Sylvie Hénault, Michel S. Zygmunt, Sylvie Poliak, and Bruno Garin-Bastuji. 2009. "Real-Time PCR for Identification of Brucella Spp.: A Comparative Study of IS711, Bcsp31 and per Target Genes." *Veterinary Microbiology* 137 (1–2): 156–64. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.023.

Broeders, S., I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens, and D. Morisset. 2014. "Guidelines for Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods." *Trends in Food Science and Technology* 37 (2): 115–26. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008.

Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.

Center for Disease Control and Prevention. 2017. "Brucellosis Reference Guide: Exposures, Testing and Prevention," 1–35. http://www.selectagents.gov/%0Ahttps://www.cdc.gov/brucellosis/pdf/brucellosi-reference-guide.pdf.

Christopher, Supriya, BL Umapathy, and KL Ravikumar. 2010. "Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis." *Journal of Laboratory Physicians* 2 (2): 55. https://doi.org/10.4103/0974-2727.72149.

Corbel, M. J., and I. Moriyón. 2006. "International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Brucella. Minutes of the Meeting, 5 and 7 July 1994, Prague, Czech Republic." *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology 56 (5): 1169–70. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64347-0.

Corbel, M.J. 2006. *Brucellosis in Humans and Animals. World Health Organization*.

Dahouk, Sascha Al, Stephan Köhler, Alessandra Occhialini, María Pilar Jiménez De Bagüés, Jens Andre Hammerl, Tobias Eisenberg, Gilles Vergnaud, et al. 2017. "Brucella Spp. of Amphibians Comprise Genomically Diverse Motile Strains Competent for Replication in Macrophages and Survival in Mammalian Hosts." *Scientific Reports* 7 (October 2016): 1–17. https://doi.org/10.1038/srep44420.

Dahouk, Sascha Al, Karsten Nöckler, Holger C. Scholz, Martin Pfeffer, Heinrich Neubauer, and Herbert Tomaso. 2007. "Evaluation of Genus-Specific and Species-Specific Real-Time PCR Assays for the Identification of Brucella Spp." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45 (11): 1464–70. https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.305.

Dean, Anna S., Lisa Crump, Helena Greter, Jan Hattendorf, Esther Schelling, and Jakob Zinsstag. 2012. "Clinical Manifestations of Human Brucellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001929.

Debeaumont, C., P. A. Falconnet, and M. Maurin. 2005. "Real-Time PCR for Detection of Brucella Spp. DNA in Human Serum Samples." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24 (12): 842–45. https://doi.org/10.1007/s10096-005-0064-0.

Doganay, Mehmet. 2013. "Human Brucellosis: Importance of Brucellosis." *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 8 (1): 2–3. https://doi.org/10.2174/157489113805290728.

Ficht, Thomas. 2010. "Brucella Taxonomy and Evolution." *Future Microbiology* 5 (6): 859–66.

Fugier, Emilie, Georgios Pappas, and Jean Pierre Gorvel. 2007. "Virulence Factors in

Brucellosis: Implications for Aetiopathogenesis and Treatment." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 9 (35): 1–10. https://doi.org/10.1017/S1462399407000543.

Głowacka, Patrycja, Dorota Zakowska, Katarzyna Naylor, Marcin Niemcewicz, and Agata Bielawska-Drózd. 2018. "Brucella – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment." *Polish Journal of Microbiology* 67 (2): 151–61. https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029.

Hull, Noah C., and Brant A. Schumaker. 2018. "Comparisons of Brucellosis between Human and Veterinary Medicine." *Infection Ecology and Epidemiology* 8 (1). https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1500846.

Kralik, Petr, and Matteo Ricchi. 2017. "A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything." *Frontiers in Microbiology* 8 (FEB): 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108.

Lemos, Tamilly Silva, Juliana Clelia Cequinel, Tania Portela Costa, Amanda Boni Navarro, Andressa Sprada, Flávia Kazumi Shibata, Regina Gondolfo, and Felipe Francisco Tuon. 2018. "Outbreak of Human Brucellosis in Southern Brazil and Historical Review of Data from 2009 to 2018." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (9): 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006770.

Lokamar, Peter N., Moses A. Kutwah, Harrysone Atieli, Sussy Gumo, and Collins Ouma. 2020. "Socio-Economic Impacts of Brucellosis on Livestock Production and Reproduction Performance in Koibatek and Marigat Regions, Baringo County, Kenya." *BMC Veterinary Research* 16 (1): 1–13. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02283-w.

Lucero, Nidia E., Gabriela I. Escobar, Sandra M. Ayala, and Nestor Jacob. 2005. "Diagnosis of Human Brucellosis Caused by Brucella Canis." *Journal of Medical Microbiology* 54 (5): 457–61. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45927-0.

Mitka, Stella, Constantine Anetakis, Efimia Souliou, Eudoxia Diza, and Athina

Kansouzidou. 2007. “Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 45 (4): 1211–18. https://doi.org/10.1128/JCM.00010-06.

Moreno, Edgardo, Axel Cloeckaert, and Ignacio Moriyón. 2002. “Brucella Evolution and Taxonomy.” *Veterinary Microbiology* 90 (1–4): 209–27. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00210-9.

Moreno, Edgardo, and Ignacio Moriyón. 2006. *The Genus Brucella*. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x.

Moulana, Zahra, Mohammad Reza Hasanjani Roushan, and Seyed Mahmoud Amin Marashi. 2016. “Evaluation of Different Primers for Detection of Brucella by Using PCR Method.” *Electronic Physician* 8 (11): 3222–27. https://doi.org/10.19082/3222.

Navarro, E., J. C. Segura, M. Jesus Castano, and J. Solera. 2006. “Use of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Monitor the Evolution of Brucella Melitensis DNA Load During Therapy and Post-Therapy Follow-Up in Patients with Brucellosis.” *Clinical Infectious Diseases* 42 (9): 1266–73. https://doi.org/10.1086/503035.

Olsen, S. C., and M. V. Palmer. 2014. “Advancement of Knowledge of Brucella Over the Past 50 Years.” *Veterinary Pathology* 51 (6): 1076–89. https://doi.org/10.1177/0300985814540545.

Opota, O., K. Jaton, and G. Greub. 2015. “Microbial Diagnosis of Bloodstream Infection: Towards Molecular Diagnosis Directly from Blood.” *Clinical Microbiology and Infection* 21 (4): 323–31. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.005.

Pappas, Georgios, Nikolaos Akritidis, Mile Bosilkovski, and Epameinondas Tsianos. 2005. “Brucellosis.” *New England Journal of Medicine* 355 (22): 2325–26.

Pappas, Georgios, Photini Papadimitriou, Nikolaos Akritidis, Leonidas Christou, and Epameinondas V Tsianos. 2006. “(2)Pappas2006” 6 (February): 91–99.

Parte, Aidan C. 2018. “LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (Bacterio.Net), 20 Years On.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (6): 1825–29. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786.

Probert, William S., Kimmi N. Schrader, Nhi Y. Khuong, Susan L. Bystrom, and Margot H. Graves. 2004. “Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of Brucella Spp., B. Abortus, and B. Melitensis.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (3): 1290–93. https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.

Rhyan, J. C. 2013. “Pathogenesis and Pathobiology of Brucellosis in Wildlife.” *OIE Revue Scientifique et Technique* 32 (1): 127–36. https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2191.

Rodrigues, Diego Leonardo, Elenice Aparecida Amorim, Fernando Ferreira, Marcos Amaku, Oswaldo Santos Baquero, José Henrique de Hildebrand E Grisi Filho, Ricardo Augusto Dias, et al. 2021. “Seroprevalence and Risk Factors for Bovine Brucellosis in the State of Paraná, Brazil: An Analysis after 18 Years of Ongoing Control Measures.” *Tropical Animal Health and Production* 53 (5): 503. https://doi.org/10.1007/s11250-021-02945-3.

Sanjuan-Jimenez, Rocio, Juan D. Colmenero, and Pilar Morata. 2017. “Lessons Learned with Molecular Methods Targeting the BCSP-31 Membrane Protein for Diagnosis of Human Brucellosis.” *Clinica Chimica Acta* 469: 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.014.

Santos, Renato L., Telma M. Martins, Álan M. Borges, and Tatiane A. Paixão. 2013. “Economic Losses Due to Bovine Brucellosis in Brazil.” *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33 (6): 759–64. https://doi.org/10.1590/s0100-736x2013000600012.

Shome, Rajeswari, Natesan Krithiga, B. S. Padmashree, Jagadesan Sankarasubramanian,

Udayakumar S. Vishnu, Jayavel Sridhar, Paramasamy Gunasekaran, Jeyaprakash Rajendhran, and Habibur Rahman. 2014. “Draft Genome Sequence of Brucella Abortus S99: Designated Antigenic Smooth Reference Strain Used in Diagnostic Tests in India.” *Genome Announcements* 2 (4): 3–4. https://doi.org/10.1128/genomeA.00824-14.

Sohn, Annette H., Will S. Probert, Carol A. Glaser, Nalin Gupta, Andrew W. Bollen, Jane D. Wong, Elizabeth M. Grace, and William C. McDonald. 2003. “Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal Brucella Spp.” *Emerging Infectious Diseases* 9 (4): 485–88. https://doi.org/10.3201/eid0904.020576.

Sohrabi, Majid, Ashraf Mohabati Mobarez, Nima Khoramabadi, Reza Hosseini Doust, and Mehrdad Behmanesh. 2014. “Efficient Diagnosis and Treatment Follow-up of Human Brucellosis by a Novel Quantitative TaqMan Real-Time PCR Assay: A Human Clinical Survey.” *Journal of Clinical Microbiology* 52 (12): 4239–43. https://doi.org/10.1128/JCM.01819-14.

Solera, Javier. 2010. “Update on Brucellosis: Therapeutic Challenges.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 Suppl 1 (November): S18-20. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.015.

Tan, Siun Chee, and Beow Chin Yiap. 2009. “DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009. https://doi.org/10.1155/2009/574398.

Tuon, Felipe Francisco, Natacha Cerchiari, Juliana Clélia Cequinel, Elizabeth El Hajjar Droppa, Suzana Dal Ri Moreira, Tânia Portella Costa, Amanda De Paula Boni Navarro, et al. 2017. “Guidelines for the Management of Human Brucellosis in the State of Paraná, Brazil.” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50 (4): 458–

64. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0319-2016.

VERGER, J.-M., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, and M. GRAYON. 2009. “Brucella, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 35 (3): 292–95. https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-292.

Yagupsky, P. 1999. “Detection of Brucellae in Blood Cultures.” *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11): 3437–42.

Yagupsky, Pablo, Pilar Morata, and Juan D Colmenero. 2020. “Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis.” *Clinical Microbiology Reviews* 33 (1): 1–54.

Zerva, L, K Bourantas, S Mitka, A Kansouzidou, and N J Legakis. 2001. “Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR.” *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4): 1661–64. https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1661-1664.2001.

Zhang, Chao, Prashant V. Thakkar, Sarah Ellen Powell, Prateek Sharma, Sreekar Vennelaganti, Doron Betel, and Manish A. Shah. 2019. “A Comparison of Homogenization vs. Enzymatic Lysis for Microbiome Profiling in Clinical Endoscopic Biopsy Tissue Samples.” *Frontiers in Microbiology* 10 (JAN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03246.

10. APÊNDICES

10. 1 - BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA ESPECIFICIDADE *IN VITRO*

Acinetobacter baumannii	*Escherichia coli*	*Pasteurella multocida*
Achromobacter xylosoxidans	*Escherichia coli* O157	*Proteus mirabilis*
Aeromonas hydrophila	*Aggregatiobacter aphrofilus*	*Pseudomonas aeruginosa*
Agrobacterium (Rhizibium) radiobacter	*Haemophilus influenzae*	*Ralstonia manitolillytica*
Burkholderia cepacia complexo	*Haemophilus parahaemolyticus*	*Salmonella enterica*
Campylobacter jejuni	*Klebsiella oxytoca*	*Serratia marcescens*
Chryseobacterium gleum	*Klebsiella pneumoniae*	*Staphylococcus aureus*
Chryseobacterium indologenes	*Listeria monocytogenes*	*Stenotrophomonas maltophilia*
Citrobacter freundii	*Moraxella catharrhalis*	*Streptococcus pneumoniae*
Eikinella corrodens	*Morganella morganii*	*Streptococcus pyogenes*
Elizabethkingia meningoseptica	*Mycobacterium tuberculosis*	*Vibrio cholerae*
Enterobacter (Klebsiella) aerogenes	*Neisseria meningitidis*	*Vibrio vulnificus*
Enterobacter cloacae complexo	*Ochrobactrum anthropi*	*Vibrio parahaemolyticus*
Enterococcus faecalis	*Ochrobactrum intermedium*	*Yersinia enterocolítica*

10.2 - RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DA qPCR – ETAPA 1

IS*711*					
Cópias IS*711* /reação	**Testes**	**Detectáveis**	**Média**	**C_q DP**	**CV ***
50.000	6 X 3	18	23.725	0.088	2.60%
5.000	6 X 3	18	27.118	0.106	5.68%
500	6 X 3	18	30.501	0.123	6.90%
250	6 x 3	18	31.470	0.226	2.73%
10	6 x 3	18	32.763	0.208	8.61%
50	6 X 3	18	33.807	0.317	14.26%
25	6 X 3	18	34.713	0.305	16.45%
10	6 X 3	18	36.092	0.624	18.66%
5	6 X 3	16	37.070	0.975	14.16%
bcsp31					
Cópias *bcsp31* /reação	**Testes**	**Detectáveis**	**Média**	**C_q DP**	**CV ***
10.000	6 X 3	18	27.109	0.095	2.92%

1.000	6 X 3	18	30.601	0.132	6.70%
100	6 X 3	18	34.070	0.251	16.78%
50	6 x 3	18	35.052	0.304	16.36%
20	6 x 3	18	36.274	0.447	3.89%
10	6 X 3	13	37.335	0.452	16.59%
5	6 X 3	8	38.506	0.267	18.37%
2	6 X 3	5	40.347	0.474	19.35%
1	6 X 3	0	-	-	-
**** Calculado após transformação do Cq em cópias por reação baseado na curva padrão***					
DP= Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação					

10.3 - RESULTADO DO ESTUDO DE CONTAMINAÇÃO *IN VITRO* – ETAPA 2

Resultados dos Valores Obtidos para Sangue Total

UFC/mL	log_{10}	Média	SD C_q	IC 95%		Detectados (n=8)	% Detecção
750000	5,875	24,045	0,117	23,947	24,142	8	100,0%
75000	4,875	27,666	0,417	27,318	28,015	8	100,0%
7500	3,875	31,749	0,249	31,541	31,957	8	100,0%
750	2,875	34,568	0,323	34,290	34,832	8	100,0%
75	1,875	37,557	0,250	37,295	37,819	6	75,0%
7,5	0,875	39,780	---	---	---	1	12,5%

Resultados dos Valores Obtidos para Soro

UFC/mL	log_{10}	Média	SD C_q	IC 95%		Detectados (n=8)	% Detecção
750000	5,875	28,181	0,088	28,107	28,253	8	100,0%
75000	4,875	31,888	0,240	31,687	32,089	8	100,0%
7500	3,875	34,735	0,244	34,531	34,939	8	100,0%
750	2,875	38,416	0,378	37,946	38,886	5	62,5%
75	1,875	39,991	---	---	---	1	12,5%
7,5	0,875	ND	---	---	---	0	---

Resultados dos Valores Obtidos para Solução Salina

UFC/mL	log_{10}	Média	SD C_q	IC 95%		Detectados (n=8)	% Detecção
750000	5,875	23,993	0,060	23,944	24,043	8	100,0%
75000	4,875	27,315	0,050	27,273	27,356	8	100,0%
7500	3,875	31,748	0,249	31,539	31,956	8	100,0%
750	2,875	34,116	0,299	33,866	34,366	8	100,0%
75	1,875	37,925	0,708	37,270	38,579	7	87,5%
7,5	0,875	39,612	0,468	38,449	40,775	3	37,5%