

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Brucella* spp. POR TÉCNICAS
MOLECULARES EM CARCAÇAS DE BOVINOS COM LESÕES
SUGESTIVAS DE BRUCELOSE**

**IDENTIFICATION OF *Brucella* spp. BY MOLECULAR TECHNIQUES IN CARCASS
OF CATTLE WITH SUGGESTIVE LESIONS FOR BRUCELLOSIS**

Irene Elisei Novaes Lauria

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Brucella* spp. POR TÉCNICAS MOLECULARES
EM CARCAÇAS DE BOVINOS COM LESÕES SUGESTIVAS DE
BRUCELOSE**

**IDENTIFICATION OF *Brucella* spp. BY MOLECULAR TECHNIQUES IN CARCASS
OF CATTLE WITH SUGGESTIVE LESIONS FOR BRUCELLOSIS**

Irene Elisei Novaes Lauria

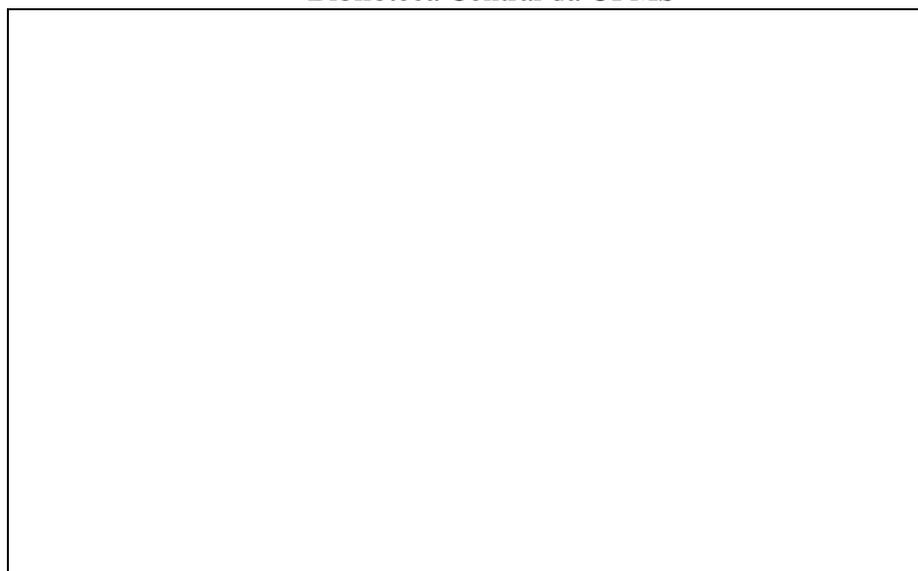
Orientador: Dr. Cleber Oliveira Soares

Co-orientadora: Dr^a. Grácia Maria Soares Rosinha

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012**

SATI-SBD
Biblioteca Central da UFMS



“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro, e ninguém é totalmente desprovido de valores, que não possa ensinar algo ao seu irmão”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro momento a Deus, que guiou meus passos, me dando forças para realizar e finalizar este trabalho.

Aos meus pais, que mesmo na distância foram meu apoio, minha esperança e minha calma.

À minha família que sempre me apóia e me orienta a seguir o melhor caminho.

Em especial a minha prima, irmã... Carina pela confiança, paciência, apoio e ensinamentos.

Às minhas amigas companheiras, Nádia e Cristiane pelo carinho, atenção, amizade, irmandade.

As meninas e meninos do Laboratório de Engenharia Genética, pelo carinho, apoio, amizade e companheirismo.

Aos meus orientadores Dr. Cleber Oliveira e Dra. Grácia Rosinha pela confiança e ensinamentos.

Ao Dr. Carlos Alberto Ramos pelo treinamento, acompanhamento das experiências que foram fundamentais para este trabalho.

Aos meus irmãos que Deus colocou em meu caminho, Flávio, Lucas, César, Felipe, Carol e Bruna pela companhia e momentos bons que passamos reunidos em nossa casa.

À Renata Madureira pela ajuda na coletas dos materiais, pela amizade e carinho.

E a todos que compartilharam comigo de forma direta e indireta nesta fase, que sem dúvidas, foi muito importante em minha vida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	06
2	REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1	HISTÓRICO.....	08
2.2	ETIOLOGIA.....	10
2.2.1	Resistência bacteriana.....	11
2.3	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E BIOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Brucella</i>	11
2.4	EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.4.1	Hospedeiro.....	14
2.4.2	Situação da Brucelose no Brasil e no Mundo.....	14
2.4.3	Transmissão.....	15
2.5	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	17
2.6	IMPORTÂNCIA.....	19
2.7	CONTROLE.....	19
2.8	DIAGNÓSTICO.....	20
2.8.1	Diagnóstico Indireto.....	21
2.8.2	Diagnóstico Direto.....	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
	ARTIGO CIENTÍFICO.....	42

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira, segundo o IBGE (2010), apresenta um rebanho de 205.292 milhões de cabeças com destaque para produção e exportação de seus produtos para 180 países nos cinco continentes (NASSAR, 2010).

Devido à grande importância da bovinocultura no Brasil, existe a necessidade de aumentar ainda mais índices de produtividade e qualidade dos seus produtos. Há também uma preocupação com barreiras sanitárias, desenvolvendo assim, programas voltados à sanidade animal por meio de tratamento, profilaxia, vacinação, controle e erradicação das doenças (BRASIL, 2006).

A brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, considerada uma doença endêmica e re-emergente desde a sua descoberta por Sir David Bruce em 1887 (CORBEL, 1997).

As perdas econômicas causadas pela brucelose são limitadas em alguns países, porém, na América Latina há estimativas oficiais de prejuízo de aproximadamente 600 milhões de dólares relacionados a esta doença (SELEEM et al., 2010). Esses prejuízos estão relacionados às barreiras comerciais internacionais de produtos de origem animal (queda de preço da carne, leite e derivados), às perdas na indústria (condenação do leite e da carne) e aos altos custos dos programas de controle e erradicação; além de causar grande prejuízo com aborto e baixa fertilidade nos animais infectados (JARDIM et al., 2006).

Esta doença é uma zoonose mundialmente distribuída, tornando-se um problema de saúde pública, oferecendo risco ocupacional para pessoas que trabalham diretamente com animais infectados e indivíduos que manipulam o microrganismo em laboratório (MOLNAR et al., 2000; PALHANO et al., 2003).

Até o momento já foram classificadas dez espécies do gênero *Brucella*, sendo cada espécie comum a um hospedeiro principal como: *Brucella melitensis* em caprinos; *Brucella abortus* em bovinos; *Brucella ovis* em ovinos; *Brucella suis* em suínos; *Brucella neotomae* em ratos do deserto; *Brucella canis* em canídeos (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984); *Brucella ceti* em golfinhos e baleias; *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos (FOSTER et al., 2007); *Brucella microti* no roedor *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008); e *Brucella inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010).

As espécies de *Brucella* são capazes de sobreviver dentro de diferentes células hospedeiras, isso explica a sua patogenicidade. O aborto, principal característica da brucelose, ocorre devido à grande replicação das bactérias no trofoblasto placentário

1 resultando em morte e expulsão fetal entre o sexto e o oitavo mês de gestação e, a persistência
2 da bactéria nos macrófagos leva às infecções crônicas (ROOP et al., 2009). Por apresentar-se
3 de forma multissistêmica em animais e no homem, a infecção inaparente constitui uma
4 importante fonte de transmissão da doença (ACHA; SZYFRES, 1980).

5 Esta doença no homem manifesta-se como uma doença aguda febril podendo
6 progredir para a forma crônica, produzindo manifestações patológicas de artrite, endocardite,
7 meningite e orquite (CORBEL, 1997; OIE, 2000).

8 Devido aos prejuízos à pecuária e pela transmissão da doença dos animais para o
9 homem, desde o início do século XX, medidas severas são tomadas na tentativa de controle e
10 erradicação como programas de eliminação da doença e o fortalecimento dos serviços de
11 saúde pública (POESTER, 2009).

12 No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), lançou em
13 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT),
14 que consiste em um conjunto de medidas buscando reduzir a prevalência da brucelose e
15 tuberculose. Os princípios básicos do programa, para o controle da brucelose bovina, é a
16 vacinação obrigatória de fêmeas com idade entre cinco a oito meses e a certificação de
17 propriedades livres ou monitoradas para a doença (BRASIL, 2006).

18 Este programa de controle da brucelose é baseado na identificação e eliminação de
19 animais infectados. Para tanto, são utilizados os testes do antígeno acidificado tamponado
20 (AAT) e o teste do anel em leite (TAL), como testes de triagem, e o teste do 2-mercaptoetanol
21 (2ME) e a fixação de complemento (FC), como testes confirmatórios, sendo os mais
22 utilizados o AAT e o 2ME.

23 Estes testes baseiam-se na resposta em nível de anticorpos e são passíveis de erros ou
24 de reações cruzadas com outras bactérias Gram negativas. Os resultados de soros testados
25 pelo 2ME podem ser negativos, falso-negativos, positivos, falso-positivos ou inconclusivos.
26 Os animais com soros que reagiram positivamente são considerados infectados e devem ser
27 sacrificados. Os animais com resultados inconclusivos ao 2ME podem ser submetidos ao teste
28 de fixação do complemento ou ser testados novamente num prazo de 30 a 60 dias com o
29 2ME.

30 Entretanto, a obtenção de outro resultado não conclusivo, o animal deve ser destinado
31 ao sacrifício, pois na impossibilidade de se determinar o status sanitário do animal, o
32 programa não pode correr o risco da manutenção de animais infectados, e conseqüentemente,
33 da infecção no rebanho (LAGE et al., 2005).

34 A fim de eliminar as fontes de infecção para brucelose, por meio de sacrifício de

1 animais positivos ou inconclusivos, utilizando testes de diagnóstico sorológico preconizado
2 pelo PNCEBT, pode levar ao país prejuízos econômico devido à eliminação ou destruição de
3 animais falso-positivos para essa doença.

4 O diagnóstico clínico da brucelose é baseado em sinais como aborto, nascimento de
5 bezerras fracas, retenção de placenta e esterilidade de machos e fêmeas. O isolamento e
6 identificação da bactéria são testes diretos e considerados como padrão ouro, porém é muito
7 complexo em relação às exigências de crescimento da bactéria (MINHARRO, 2009).

8 Outros métodos de diagnóstico, como testes moleculares, são capazes de detectar o
9 DNA de *Brucella* spp. em fluídos corporais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas
10 variantes (PCR multiplex, PCR em tempo real) têm sido desenvolvidas e aplicadas ao
11 diagnóstico de diversos patógenos (KIM et al., 2007; LIM et al., 2008) assim como *Brucella*
12 spp. (BOUNAADJA et al., 2009)

13 Neste contexto, objetiva-se neste trabalho a identificação de *Brucella* spp. em carcaças
14 de animais apresentando lesões sugestivas para brucelose, por técnicas moleculares,
15 proporcionando ao PNCEBT uma alternativa de um teste mais rápido, sensível e específico
16 para o diagnóstico desta doença.

17 18 **2 REVISÃO DE LITERATURA**

19 20 **2.1 Histórico**

21
22 A brucelose é uma zoonose relatada há mais de dois mil anos. Pacientes com sintomas
23 compatíveis com a doença foram descritos por Hipócrates em 460 a.C. Pesquisas recentes,
24 realizadas na Itália, revelaram esqueletos que apresentavam lesões ósseas típicas de brucelose,
25 que por microscopia eletrônica foi revelada a presença de coco bacilos compatíveis
26 com *Brucella* spp. (CAPASSO, 2002).

27 Esta doença infectocontagiosa foi descrita pela primeira vez no ano de 1887 por Sir
28 David Bruce, que isolou do fígado de quatro soldados britânicos o agente *Micrococcus*
29 *melitensis*, que foi responsável pela febre de malta ou febre do mediterrâneo. Essas vítimas
30 foram fatais, determinando assim uma relação entre o consumo de leite de cabras
31 contaminadas com *Brucella melitensis*, consumidas por estes soldados, como o responsável
32 causador da doença (GODFROID et al., 2005).

33 Em 1895, o patologista veterinário dinamarquês L. F. Bernhard Bang isolou uma
34 bactéria de fetos abortados de bovinos denominada *Bacillus abortus*, e identificou o agente

1 etiológico do aborto enzoótico dos bovinos (NICOLETTI, 2002). Esses microrganismos
2 foram posteriormente chamados de *Brucella abortus* em homenagem ao seu descobridor
3 (LEÓN, 1994).

4 Um microrganismo similar ao agente *Brucella melitensis* foi isolado por Traum em
5 um leitão abortado em 1914 nos EUA (CORRÊA et al., 1992) e em 1928 Huddleson propôs a
6 distinção de uma nova espécie como *Brucella suis* (FERREIRA et al., 1990).

7 Em 1953, Buddle e Boyes, na Austrália, isolaram de ovinos uma nova espécie que foi
8 denominada *Brucella ovis*. Em 1957, nos EUA, Stoenner e Lachman isolaram de um rato do
9 deserto (*Neotoma lepida*), outra espécie que denominaram de *Brucella neotomae*, que até hoje
10 não se mostrou patogênica para os animais domésticos e ao homem. Em 1966, também nos
11 EUA, Carmichael isolou de cães uma espécie que mostrava patogenicidade para cães e para o
12 homem, denominando-a de *Brucella canis* (CORRÊA et al., 1992).

13 O gênero *Brucella* até o ano de 1985 se constituía de seis espécies (*B. melitensis*, *B.*
14 *abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* e *B. ovis*). Neste mesmo ano foi proposta a classificação
15 dessas espécies em uma única, denominada *B. melitensis*, e o restante destas serem
16 reconhecidos como biovares (VERGER et al., 1985). Porém, no ano de 2003 o Subcomitê da
17 Taxonomia de *Brucella* decidiu o retorno da nomenclatura do gênero *Brucella* que implica a
18 re-aprovação dos seis nomes clássicos com seus respectivos biovares (OSTERMAN., 2006).

19 No ano de 2007 duas outras espécie foram descritas, *Brucella pinnipedialis* que infecta
20 preferencialmente pinípedes e, *Brucella ceti* que infecta cetáceos (FOSTER et al., 2007). Em
21 2008 uma nova espécie foi isolada em ratos do deserto denominada de *Brucella microti*
22 (SCHOLZ et al., 2008).

23 Recentemente foi isolada *Brucella inopinata* de uma infecção em uma paciente com
24 implante mamário apresentando sintomas clínicos e com quadro de brucelose, constituindo
25 assim até a data de hoje 10 espécies de *Brucella* já conhecidas (SCHOLZ et al., 2010) .

26 Algumas bactérias sugestivas à bactéria do gênero *Brucella* foram isoladas de ratos
27 nativos da Austrália, mas ainda não foram incluídas neste gênero (TILLER et al., 2010), bem
28 como em associação com dois casos de morte fetal em primatas não-humanos
29 (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009).

30 O primeiro estudo sobre brucelose bovina no Brasil foi feito por Tineciro Icibaci que,
31 por meio de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos de tecidos provenientes de
32 fetos abortados, descreveu um foco de brucelose bovina ocorrido no município de São Carlos,
33 SP, em 1922. Mello e Neiva, em 1928, isolaram *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia
34 abortado (PAULIN et al., 2002).

1 Em 1976 foi implementado no Brasil um programa de erradicação que não obteve os
2 resultados esperados, visto a necessidade do controle da doença. O Ministério da Agricultura,
3 Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou o primeiro inquérito sorológico nacional e, desde
4 então, apenas cinco estudos estaduais foram conduzidos (PAULIN et al., 2002). No ano de
5 2001 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou o Regulamento
6 Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose –
7 PNCEBT, utilizado até nos dias de hoje para o controle da doença (BRASIL, 2001).

10 **2.2 Etiologia**

12 Brucelose é uma doença bacteriana infecciosa causada por membros do gênero
13 *Brucella* (HIRSH et al., 2003), pertencente à família Brucellaceae Rhizobiales da classe
14 Alphaproteobactéria (VERGER et al., 1985).

15 Essas bactérias são parasitos intracelulares facultativos, Gram-negativos,
16 pleomórficos, imóveis, não capsulados, não esporulam e variam de 0,4 e 0,8 µm de largura e
17 0,5 a 0,7 µm de comprimento (POESTER, 1997). Podem estar dispostas isoladamente e
18 raramente em cadeias curtas, apresentando coloração bipolar (CAMPAÑA et al., 2003;
19 BRASIL, 2005), podem ter a forma de diplococos e, em meio de cultura, observam-se formas
20 de involução (FERREIRA et al., 1990), apresentam-se também em formas cocóides, que
21 superam numericamente as formas bacilares sob certas condições de cultivo. Normalmente se
22 apresentam como bacilos curtos (POESTER, 1997).

23 A temperatura de crescimento dessas bactérias é de 20 a 40°C sendo 37°C a
24 temperatura ideal para o isolamento inicial e, o pH ideal é de 6,6 a 7,4; são aeróbias e
25 microaerófilas necessitando de 5 a 10% de CO₂ (CORRÊA et al., 1992; HIRSH et al., 2003;
26 OIE, 2009).

27 As três principais espécies são subdivididas em biovariedades ou biovares: *B. abortus*
28 – 8 biovares; *B. melitensis* – 3 biovares; *B. suis* – 5 biovares (BRASIL, 2005).

29 Classicamente, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois grupos
30 antígenicamente distintos, denominadas lisas ou rugosas, com base nas características de
31 multiplicação em meios de cultura no cultivo primário e na constituição química da parede
32 celular – presença ou ausência da cadeia O – um dos componentes do lipopolissacáride (LPS)
33 localizado na superfície externa, apresentando uma relação com a virulência de algumas
34 espécies (CARDOSO et al., 2006).

2.3 Resistência bacteriana

A capacidade de sobrevivência das espécies de *Brucella* em condições naturais é grande quando comparada a outras bactérias patogênicas não esporuladas, pois ela possui resistência à determinados produtos e ambientes, por períodos prolongados em circunstâncias favoráveis como ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e ambientes contendo matéria orgânica (CRAWFORD et al., 1990; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Brucella abortus pode permanecer nas pastagens por seis meses ou mais em resíduos de abortos ou partos. As espécies de *Brucella* são sensíveis à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, em concentrações que são utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e ambiente (RUSSEL et al., 1984).

Em carnes, as *Brucella* spp. podem se manter viáveis durante meses, sendo pouco afetada pela acidificação muscular, refrigeração ou congelamento. Além do calor, a eliminação do agente só ocorre em situações de pH inferior a 4 (PESSEGUEIRO et al., 2003).

A sobrevivência da bactéria no leite e produtos lácteos, depende da temperatura, pH e outros agentes que possam inibir sua multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 à 90 dias (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

2.4 Características Genéticas e Biológicas das espécies de *Brucella*

A composição do DNA de todas as espécies do gênero *Brucella* é semelhante apresentando uma homologia superior a 94%, sendo ela composta de 58 a 59% de guanina mais citosina, muito parecido quando comparado à *Escherichia coli* (SMITH, 1990; HORVAT et al., 2011), apesar de apresentar essa semelhança alguns métodos de genotipagem molecular têm sido desenvolvidos e aplicados para caracterizar as espécies de *Brucella*, indicando que ocorrem polimorfismos de DNA entre estas dando suporte a atual classificação das mesmas (HALLING et al., 2005).

Estudos recentes com base na análise comparativa do genoma completo de várias espécies de *Brucella* indicam que há pequenas diferenças com um grande número de pseudogenes. Porém, estas análises genômicas não explicam claramente a preferência das espécies de *Brucella* por determinado hospedeiro (FOSTER et al., 2009; WATTAM et al., 2009).

1 Uma característica das espécies de *Brucella* é a sequência da inserção *IS711* que
2 ocorre em número variável e posição, mas sempre constante dentro de uma dada espécie. Esse
3 polimorfismo também é utilizado na tipagem molecular e identificação de cada espécie
4 (MANCILLA et al., 2011).

5 Para a identificação do gênero *Brucella* também é bastante utilizado os genes *virB5*
6 que faz parte do operon *virB* e está presente nas espécies de *Brucella* (HANTING et al. 2008),
7 *16S* (região *Ssu-rDNA*, sub-unidade menor do ribossomo nuclear) (RIJPENS et al., 1996),
8 *Omp 2A* (proteína de membrana 2A), (VIZCAÍNO et al., 2001), *per* (perosamine sintetase)
9 (BOGDANOVICH et al., 2004), *bcs31* (MATAR et al., 1996) selecionados para a
10 diferenciação entre as espécies gram-negativas, e o gene *ery*, essencial para o catabolismo do
11 eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos), utilizado na diferenciação das cepas vacinais
12 e obtidas a campo. Estes genes são pouco mutáveis (altamente conservados), por se tratarem
13 de genes efetivos na fisiologia dos organismos e são genes considerados padrão nos estudos
14 de identificação de *Brucella* spp (SANGARI, 2000).

15 Estruturalmente as espécies do gênero *Brucella* apresentam em sua parede celular o
16 lipopolissacarídeo (LPS) que está diretamente relacionado com a morfologia colonial e com a
17 presença ou ausência da cadeia “O”, componente químico denominado de perosamina que
18 está localizado na superfície externa da parede celular de *Brucella* spp. determinando a
19 característica lisa ou rugosa da colônia (ALTON et al., 1988). Estudos mostraram que
20 colônias lisas podem se tornar rugosas espontaneamente e reverter-se à forma lisa novamente
21 (ALTON et al, 1988). Essas mudanças são mediadas pela modulação ou deleção de genes
22 responsáveis pela síntese da cadeia O ou outros genes responsáveis pela biosíntese do LPS
23 (GORVEL & MORENO, 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

24 As espécies de *Brucella* podem ser classificadas por meio de uma bateria clássica de
25 ensaios bioquímicos, baseados em diferentes características: metabólicos (urease, oxidase,
26 produção de H₂S), crescimento em meios com corantes (tionina e fuccina), morfologia das
27 colônias, requerimento de soro no crescimento e sensibilidade a fagos (CORBEL, 1997).

28 De acordo com Hirsh e colaboradores (2003), as principais cepas lisas (*B. abortus*, *B.*
29 *melitensis*, *B. suis* e *B. neotomae*) em geral são mais virulentas que as rugosas (*B. ovis*, *B.*
30 *neotomae* e *B. canis*).

2.5 Epidemiologia

A brucelose está na lista de doenças notificáveis da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), sendo considerada uma enfermidade transmissível (OIE, 2008), não comumente de pessoa a pessoa, tornando-se insignificante do ponto de vista epidemiológico (GODFROID et al., 2005), porém, a importância e gravidade da enfermidade no ser humano justifica amplamente sua erradicação (CARVALHO-NETA et al., 2010).

A epidemiologia da brucelose na produção animal tem sido descrita em muitos países, como pode ser observado pelo número de relatórios gerados nos últimos 10 anos, apresentando uma estimativa de soroprevalência de gado em torno de 3 a 15% no mundo (GHANEM et al., 2009; HAILESELASSIE et al., 2010).

Várias doenças que afetam animais domésticos que têm programas de controle não estão focadas em reservatórios silvestres, como o caso da brucelose no Brasil (LAGE et al., 2008). Dessa forma, devastações florestais, sistemas de produção e criação, desenvolvimento agressivo da agricultura, aumento da produção de carne e mesmo a indústria do turismo com zonas agro-ecológicas estão associados com a transmissão dessa zoonose (ZINSSTAG et al., 2007; MATOPE et al., 2010).

A prevalência da brucelose nos animais domésticos está intimamente relacionada com os animais selvagens sendo eles os principais reservatórios da doença. Estudos mostram que o problema é improvável de ser rapidamente resolvido, com a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas, diagnósticos e procedimentos de gestão para o controle eficaz da brucelose (HERRERA et al., 2010).

Para o melhor conhecimento da epidemiologia de uma enfermidade, é necessário o conhecimento do melhor método de diagnóstico da doença, permitindo assim estudar a ocorrência, distribuição e caracterização do agente em questão (MINHARRO et al., 2009).

2.5.1 Hospedeiros

As bactérias do gênero *Brucella* são generalistas quanto aos seus hospedeiros (HOEDEN, 1964; HIRSH et al., 2003).

As espécies *B. suis* e *B. melitensis* também pode causar brucelose nos bovinos quando estes estão em convívio com suínos, cabras e ovinos que são respectivamente, os reservatórios naturais desses agentes (ACHA & SZYFRES 1986; OIE, 2008). Infecções cruzadas com *B.*

1 *melitensis* foram observados em rebanhos de bovinos integrado com ovinos e caprinos no sul
2 da Europa (VERGER et al., 1989) e são publicados regularmente no Oriente Médio, onde
3 tornou-se um problema de saúde veterinária e pública (SAMAH et al., 2008).

4 Atualmente, três espécies do gênero *Brucella* apresentam um maior impacto na saúde
5 pública sendo a *B. melitensis* a mais patogênica e invasora para o homem, considerada exótica
6 no Brasil, pois não foi isolada no país (POESTER et al., 2002), seguida da *B. abortus* e *B. suis*
7 (ACHA & SZYFRES, 2001; GODFROID et al., 2010), embora, a *B. abortus* seja a mais
8 freqüente causadora de infecção humana no mundo.

11 2.4.2 Situação da Brucelose no Brasil e no Mundo

13 A brucelose bovina é considerada uma zoonose cosmopolita, sendo de maior
14 importância em países em desenvolvimento. Dois fatores determinam a sua importância: a
15 perda na produção animal e a repercussão da infecção sobre a saúde humana (RADOSTITS et
16 al., 2002; PALHANO et al., 2003).

17 Essa doença foi erradicada em diversos países da região norte e centro da Europa,
18 Canadá, Austrália, Japão e Nova Zelândia (OIE, 2008). França, Grécia, Irlanda, Itália,
19 Portugal e Espanha, embora ainda não tenham sido declaradas como livres da brucelose
20 bovina, encontram-se em fase adiantada de erradicação (GODFROID & KÄSBOHRER,
21 2002), enquanto que a África, América do Sul e Oriente Médio possuem a maior
22 concentração da doença (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

23 Na Grã-Bretanha, a brucelose bovina foi erradicada em 1979, e o país foi reconhecido
24 como livre da doença desde 1985. Nesse país, a doença foi reintroduzida em várias ocasiões,
25 especialmente por meio de gado importado, sendo, detectada pelo sistema de vigilância, que
26 inclui testes mensais em amostras de leite nos rebanhos leiteiros, testes sorológicos periódicos
27 em gado de corte, controle rigoroso da criação em animais importados e investigação
28 minuciosa de abortos (McGIVEN et al., 2008).

29 A enfermidade ainda ocorre na maior parte da América Latina, especialmente em
30 países com grandes rebanhos bovinos, como Argentina, Brasil e México (ACHA &
31 SZYFRES, 2001).

32 O Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo (IBGE) e a brucelose é
33 considerada uma doença endêmica sendo ela diagnosticada em todo o território nacional
34 (POESTER et al., 2002).

1 A situação epidemiológica em alguns Estados brasileiros foi relatada por alguns
2 autores no ano de 2009. Chate e colaboradores (2009) detectaram para o Estado de Mato
3 Grosso do Sul uma prevalência de focos de 41,5%, sendo o rebanho considerado positivo se
4 pelo menos um animal fosse reagente à prova sorológica. A prevalência de focos de brucelose
5 para o Estado de Santa Catarina foi de 0,32% (SIKUSAWA et al., 2009), resultados
6 semelhantes aos obtidos em dois estudos anteriores realizados no estado, o primeiro em 1975,
7 e o segundo em 1996, que estimaram a prevalência em 0,2% e 0,6%, respectivamente
8 (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

9 A prevalência para o Estado do Espírito santo foi de 9,0% (AZEVEDO et al., 2009),
10 em São Paulo de 9,7% (DIAS et al., 2009), Distrito federal de 2,52% (GONÇALVES et al.,
11 2009), 4,2% para o estado da Bahia (ALVES et al., 2009) e 6,04% para Minas Gerais
12 (GONÇALVES et al., 2009).

13 Em um estudo realizado no ano de 2003 e 2004 pela IAGRO do estado de Mato
14 Grosso do Sul, utilizando amostras de 210 propriedades e colhidas 2.376 amostras de sangue
15 de fêmeas, com idade igual ou superior a 24 meses de idade com o intuito de avaliar a
16 prevalência da brucelose bovina e os fatores de risco associados a esta infecção, demonstrou
17 que a brucelose é prevalente nas propriedades estudadas com 5,6% de animais soropositivos e
18 que o controle da doença deve consistir em especial atenção à exploração do tipo corte, à raça
19 zebuína e à presença de aborto (MONTEIRO, 2004).

20 Devido à importância e a alta prevalência desta doença no rebanho nacional, são
21 gerados barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos
22 diretos e indiretos, pois se trata de uma doença de extrema importância na área veterinária e
23 para a saúde pública.

24 25 26 2.5.3 Transmissão

27
28 As principais formas de contaminação de animais e o homem com brucelose, são por
29 meio da via oral, trato respiratório, trato genital, pele e conjuntiva (ACHA & SZYFRES,
30 2001).

31 A transmissão de *Brucella* entre animais e humanos, pode ocorrer de forma direta,
32 como por exemplo, por meio do contato com fetos abortado, ou indireta, por meio da ingestão
33 de alimentos contaminados (GODFROID et al., 2005).

1 Nos países do sul da Europa e Israel, o consumo de leite não pasteurizado é o maior
2 responsável por causar brucelose em humanos, devido a capacidade da *B. melitensis*
3 (ASHFORD et al., 2004; LAMONTAGNE et al., 2010) e *B. suis* biovar 1 (CORBEL, 1997)
4 colonizar o úbere de bovinos.

5 A transmissão da doença se faz principalmente pelo contato direto com fetos
6 abortados, placentas e descargas uterinas infectadas, eliminadas no ambiente em grande
7 quantidade no momento do parto ou aborto (ENRIGHT, 1990), podendo o animal eliminar a
8 bactéria por meio dessas secreções por aproximadamente 30 dias (CRAWFORD et al., 1990).

9 A transmissão de *Brucella* spp. para o homem representa um grave problema de saúde
10 pública, sobretudo pelo caráter ocupacional na manipulação de carcaças contaminadas em
11 matadouros e propriedades rurais ou por ingestão de alimentos crus contaminados de origem
12 animal ou, ainda, por acidentes vacinais ou laboratoriais acometendo principalmente
13 assistentes agropecuários, médicos veterinários, tratadores, vaqueiros, laboratoristas e
14 magarefes (CAMPAÑA et al., 2003).

15 Os animais contaminados transmitem as bactérias do gênero *Brucella* através do parto
16 ou aborto. Fêmeas após abortarem a primeira vez, em decorrência desta doença, tornam-se
17 portadoras crônicas, eliminando a bactéria pelo leite, urina e descargas uterinas durante os
18 partos subseqüentes, abortando ou não (PACHECO, 2007).

19 Bezerros de vacas brucélicas podem ser infectados verticalmente no útero, durante ou
20 após o parto e ainda quando alimentados com leite dessas fêmeas positivas (FICHT, 2003).
21 Esses filhotes podem se tornar portadores dessa doença, albergando o agente nos linfonodos
22 que drenam o trato gastrointestinal e assim excretam a bactéria pelas fezes (PAULIN &
23 FERREIRA NETO, 2003).

24 Devido ao hábito de se lambar e cheirar animais recém-nascidos, há um favorecimento
25 da difusão da doença entre os bovinos, podendo também ser transmitida através de água,
26 comida e fômites contaminados (CAMPOS et al., 2003).

27 A transmissão venérea é rara, pois as fêmeas apresentam barreiras inespecíficas na
28 vagina que dificultam a infecção (PAULIN & FERREIRA NETO 2003), porém, as vacas
29 podem ser contaminadas por inseminação artificial com uso de sêmen contaminado
30 (CAMPERO, 1993). Entretanto, propriedades estruturadas do ponto de vista zootécnico e
31 sanitário têm menos chance de serem focos de brucelose bovina (CHATE et al., 2009),
32 utilizando-se técnicas seguras para transferência de embriões conforme recomendações
33 internacionais como o uso de lavagens dos embriões (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1999).

1 A introdução de animais contaminados em rebanhos sadios, constitui o principal risco
2 às propriedades rurais, com isso a comercialização de animais só deve ocorrer quando a
3 condição sanitária seja conhecida, sendo o ideal a comercialização de animais posteriormente
4 a submissão dos mesmos à testes de diagnóstico que garantem a sua sanidade (LAGE et al.,
5 2008; RIBEIRO et al., 2008).

6 7 8 **2.6 Patogenia e Sinais Clínicos**

9
10 A capacidade das espécies de *Brucella* de sobreviver e se multiplicar dentro de
11 diferentes células hospedeiras explica a sua patogenicidade, sendo elas protegidas do ataque
12 do sistema imune (XAVIER et al., 2009).

13 O aborto em seus hospedeiros preferenciais está associado à replicação dessa bactéria
14 no trofoblasto placentário. O microorganismo sobrevive dentro de macrófagos e neutrófilos
15 protegendo-se assim dos mecanismos de defesa humoral e celular; sua persistência em
16 macrófagos leva a infecções crônicas que são uma característica da brucelose nos hospedeiros
17 animais naturais e humanos (ROOP et al., 2009).

18 Após a infecção os microorganismos são fagocitados pelos leucócitos onde
19 sobrevivem e se multiplicam. Estes são levados ao tecido linfóide, onde se replicam (10 a 21
20 dias após a infecção), ocorrendo uma bacteremia e levando à infecção sistêmica e
21 favorecendo a colonização em útero gravídico, medula óssea, articulações, órgãos genitais
22 masculinos, glândula mamária e placenta fetal (KO & SPLITTER, 2003; MARQUES, 2003;
23 PALHANO, 2003;).

24 As espécies de *Brucella* apresentam sistema de secreção tipo VI (T4SS) que é
25 codificada pelo *operon* VirB (COMERCI et al., 2001; DELRUE et al., 2001). Este *operon* é
26 composto por 12 genes identificados como *virB1* até *virB12*. O T4SS foi reconhecido como
27 um mecanismo de virulência essencial de *B. abortus*, sendo ele necessário para a
28 multiplicação intracelular do organismo em células fagocíticas e não fagocíticas
29 (O'CALLAGHAN et al., 1999; HONG et al., 2000; SIEIRA et al., 2000).

30 Devido ao seu potencial zoonótico, a brucelose deve ser diferenciada de várias outras
31 doenças que causam aborto em bovinos. A infecção pode variar dependendo da idade, estado
32 reprodutivo e imunológico, da resistência natural, da via de infecção, do desafio infeccioso e
33 da virulência da cepa infectante (NICOLETTI, 1980; ADAMS, 2002).

1 Embora a infecção possa ocorrer através da pele, conjuntiva ou mucosa respiratória
2 por inalação (CRAWFORD et al., 1990; KO e SPLITTER, 2003), a rota mais comum de
3 infecção em bovinos é o trato gastrointestinal (CRAWFORD et al., 1990).

4 Os animais infectados apresentam características clínicas variáveis, que são fortemente
5 dependentes da bactéria e espécies hospedeiras. Touros infectados podem desenvolver sinais
6 sistêmicos de infecção como febre, anorexia e depressão, embora a infecção geralmente seja
7 inaparente (CAMPERO et al., 1990; SANTOS et al., 2005).

8 A lesão mais significativa induzida por *B. abortus* em touros é orquite (TRICHARD et
9 al., 1982), que é frequentemente associada com vesiculite seminal e epididimite
10 (McCAUGHEY & PURCELL, 1973). Como resultado da orquite crônica e fibrose do
11 parênquima testicular, touros afetados podem desenvolver infertilidade permanente
12 (CAMPERO et al., 1990).

13 Normalmente vacas prenhas desenvolvem uma linfadenopatia no local de infecção que
14 progride para linfadenite aguda (SCHLÄFER & MILLER, 2007); as lesões consistem de
15 placentite necrótica e mastite intersticial, e pleurite fibrinosa com pneumonia intersticial em
16 fetos abortados e bezerras recém-nascidos (CARVALHO-NETA, 2010).

17 No caso dos fetos abortados, estes podem desenvolver lesões nos brônquios e gânglios
18 linfáticos (GORHAM et al., 1986), aumento das glândulas supra-renais, e hipotrofia do timo,
19 que pode estar associada com hemorragias petequiais (ENRIGHT et al., 1984).

20 A espécie *B. abortus* tem um forte tropismo pelo útero durante o último trimestre de
21 gestação pela altas concentrações de eritritol e hormônios esteróides. O eritritol favorece a
22 sobrevivência de bactérias, pois pode ser metabolizado por *B. abortus* como uma fonte de
23 carbono e energia (SAMARTINO & ENRIGHT, 1996). A multiplicação da bactéria induz
24 células inflamatórias, necrose trofoblástica e vasculite, conseqüentemente, as trocas
25 metabólicas materno-fetal são comprometidas, resultando em aborto (ANDERSON et al.,
26 1986).

27 Nos humanos, os sinais clínicos da brucelose incluem febre, anorexia, poliartrite,
28 meningite, pneumonia, endocardite e outros menos comuns (SAURET & VILISSOVA,
29 2002).

30 Vale ressaltar que os órgãos de predileção da *Brucella* são aqueles que oferecem
31 elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol presente no útero gravídico,
32 tecidos mamários, osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino, sendo que
33 humanos, eqüídeos, coelhos e roedores possuem ausência ou baixa quantidade de produção do

1 eritritol, fato que justifica o reduzido impacto da brucelose no aparelho reprodutor dessas
2 espécies (XAVIER et al., 2009; RIBEIRO et al., 2008).

5 **2.7 Importância Econômica**

7 A bovinocultura no Brasil assume uma grande importância no cenário do agronegócio
8 mundial por possuir o segundo maior rebanho efetivo do mundo, apresentando cerca de 200
9 milhões de cabeças, proporcionando assim um valor estimado da produção em 67 bilhões de
10 dólares (BRASIL, 2011).

11 A brucelose além de ser um grande problema de saúde pública, no ponto de vista
12 econômico, assume um papel de grande importância por causar nos animais domésticos,
13 infecções que estão associadas principalmente a problemas reprodutivos como abortamentos,
14 nascimento de crias fracas e baixa fertilidade, com efeitos desastrosos para a pecuária
15 (POESTER et al., 2009).

16 A doença é amplamente disseminada (CORBEL et al., 2006) e uma vez instalada no
17 rebanho além da queda na produção animal, a brucelose faz com que os produtos originados
18 dessa atividades como leite e a carne fiquem vulneráveis à barreiras sanitárias sofrendo assim
19 queda no valor no mercado internacional (SILVA & ITAVO, 2002).

20 Alguns estudos mostraram que a brucelose é responsável pela diminuição de 25% na
21 produção de leite e de carne e pela queda de 15% na produção de bezerros, mostrando que a
22 cada cinco vacas infectadas, uma aborta e uma torna-se estéril (BRASIL, 2005).

23 Assim, por causar prejuízo à pecuária e ser transmitida dos animais para o homem,
24 desde o início do século XX, muitos países têm adotado medidas severas de controle ou
25 erradicação da brucelose na população animal.

28 **2.8 Controle**

30 Para a brucelose bovina, as estratégias de combate são bastante conhecidas e podem
31 ser resumidas em vacinação, certificação de propriedades livre, controle da movimentação de
32 animais e sistema de vigilância específico (POESTER et al., 2009).

33 De acordo com as necessidades do controle da doença, a implementação de programas
34 bem sucedidos de erradicação tem sido necessário, porém esses programas muitas vezes são

1 caros, longos e difíceis de ser realizados devido a varias condições. A maior dificuldade é em
2 relação à política de gestão nas propriedades com criação extensiva, deslocamento dos
3 animais, existência de varias espécies de animais, entre outras (GODFROID et al., 2011).

4 Nos países desenvolvidos, o controle da brucelose animal tem sido alcançado com
5 sucesso por meio da combinação de vacinação, teste e abate dos animais positivos e, para a
6 brucelose humana por meio da pasteurização do leite (McDERMOTT & ARIMI, 2002;
7 PAPPAS et al., 2006), juntamente com a vigilância eficaz da doença e no controle no
8 transporte animal.

9 Nos países em desenvolvimento, no entanto, o controle da doença por testes e abate de
10 animais positivos dificilmente será alcançável devido aos recursos limitados para a
11 indenização aos agricultores, cujos animais são abatidos durante o programa de certificação
12 (McDERMOTT & ARIMI, 2002).

13 No Brasil, em Janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
14 (MAPA) verificando a ineficiência das medidas até então tomadas para o controle da
15 Brucelose e Tuberculose, lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da
16 Brucelose e Tuberculose – PNCEBT (PAULIN et al., 2002) visando melhorar o controle
17 destas doenças no país e a produção de alimentos com melhor qualidade sanitária destinado
18 ao mercado interno e externo (BRASIL, 2001).

19 As ações do PNCEBT visa a implementação de um programa de vacinação obrigatória
20 com a vacina B19 de *B. abortus* em fêmeas de 3 a 8 meses de idade, a realização de um
21 estudo de prevalência em vários estados do país e a formação de recursos humanos para atuar
22 no programa (MINHARRO, 2009).

23 24 25 **2.9 Diagnóstico**

26
27 A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos isoladamente ou em
28 conjunto e, a correta identificação dos animais positivos é uma das bases de um programa de
29 controle ou vigilância epidemiológica da brucelose bovina (POESTER, 2005). A evolução
30 lenta e assintomática da doença exige um diagnóstico seguro para a tomada de medidas de
31 erradicação (BEER, 1999).

32 Dados epidemiológicos da região e diagnóstico clínico baseado em abortos,
33 nascimento de bezerros fracos, esterilidade de machos e fêmeas proporcionam apenas uma

1 indicação da provável presença da enfermidade no rebanho (MOLNÁR, 1997; POESTER,
2 2005).

3 O principal objetivo no diagnóstico da brucelose é a identificação dos animais que
4 estão infectados e os que abrigam o microorganismo e disseminam a enfermidade. Muitas
5 vezes animais positivos são identificados quando utilizado o teste sorológico padronizado
6 antígeno acidificado tamponado (AAT), porém a infecção pode ocorrer em animais
7 sorologicamente negativos e em animais vacinados (BLOOD et al., 1991).

8 A brucelose pode ser diagnosticada indiretamente através da detecção de anticorpos
9 por meios sorológicos, ou diretamente através da detecção do agente etiológico (POESTER et
10 al., 2005).

11

12

13

14 2.9.1 Diagnóstico Indireto

15

16 No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os testes de Antígeno Acidificado
17 Tamponado (AAT) e Anel em Leite (TAL) para triagem, sendo a confirmação dos resultados
18 positivos efetuada pela combinação do Teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) com
19 o Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) ou pela reação de Fixação de Complemento (RFC)
20 (BRASIL, 2005).

21 Os testes sorológicos detectam anticorpos contra *Brucella* spp. presente em diversos
22 fluidos corporais como leite, soro sanguíneo, muco vaginal, sêmem e leite (POESTER et al.,
23 2005).

24 O teste AAT descrito por Alton (1976) que é um teste qualitativo, rápido e prático
25 (VASCONCELOS et al., 1987; PAULIN & FERREIRA NETO 2003), sendo de alta
26 sensibilidade (> 99%), porém para aumentar a especificidade do teste pode ser aplicado a
27 uma diluição seriada das amostras de soro (RUIZ-MESA et al., 2005).

28 O teste AAT apresenta algumas desvantagens como atividade residual de anticorpos
29 induzidos pela vacinação de bezerras com idade superior a oito meses, anticorpos colostrais,
30 erros laboratoriais e ainda, reações cruzadas com outras bactérias gram-negativas que
31 interferem no teste apresentando resultados falsos positivo (FERRAZ, 1999; RADOSTISTS
32 et al., 2002; PAULIN & FERREIRA NETO 2003).

33 Outros fatores como inibição da aglutinação nas diluições mais baixas dos testes de
34 ligação secundária, infecções recentes, período pré e pós parto e aborto, 15 dias antes e 30

1 dias após, as fêmeas apresentam baixos títulos, pois ocorre a mobilização de anticorpos para o
2 colostro e para o líquido fetal (CRAWFORD et al., 1990).

3 Como um dos testes confirmatório para brucelose é utilizado o 2-ME que contém um
4 radical tiol, que destrói os anticorpos da classe IgM e detecta exclusivamente IgG
5 (CAVALLÉRO, 1998; MEGID et al., 2000) o que permite detectar o estado de infecção ativa
6 (McMILLAN, 1990; SAMARTINO et al., 2000).

7 Para melhorar as interpretações dos resultados, esta prova deve ser realizada
8 simultaneamente com a prova lenta em tubos e nas mesmas diluições (POESTER, 1997).
9 Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e
10 reações positivas na prova lenta.

11 Os resultados positivos obtidos por este teste estão relacionados com a infecção,
12 porém, os resultados inconclusivos devem ser definidos por outras provas como fixação de
13 complemento ou, devem-se refazer os testes com esses animais em um prazo de 30 a 60 dias
14 (BRASIL, 2005).

15 Há ainda o teste de polarização fluorescente, que foi validado para diagnóstico de
16 brucelose em várias espécies incluindo bovinos (NIELSEN et al., 1995; McGIVEN et al.,
17 2003), ovinos e caprinos (MINAS et al., 2005; MINAS et al., 2007), suínos (NIELSEN et al.,
18 1999), seres humanos (LUCERO et al., 2003) e animais selvagens (MONTAGNARO et al.,
19 2008).

20 21 22 2.7.2 Diagnóstico Direto

23
24 Os métodos diretos de diagnóstico para brucelose incluem o isolamento e a
25 identificação do agente, métodos de detecção de ácidos nucléicos, pela reação em cadeia da
26 polimerase (PCR) e pela imunohistoquímica.

27 O padrão ouro para o diagnóstico da brucelose é o isolamento e identificação do
28 agente etiológico, pois possui a vantagem de ter alta especificidade e capacidade de identificar
29 diferentes espécies e biovars, importante para o estudo da epidemiologia da doença (LAGE
30 et al., 2008). Entretanto essa prática torna-se pouco viável para o uso rotineiro, pois é um
31 método trabalhoso e necessita de laboratório de biossegurança nível 3 (NB3), de material de
32 boa qualidade (POESTER, 2005), além de profissionais bem treinados e qualificados
33 (MINHARRO, 2009).

1 Para o diagnóstico bacteriológico é importante que sejam utilizados meios de cultura
2 seletivos, a adição de 5% a 10% de CO₂, em especial ao isolá-la pela primeira vez e, contendo
3 ainda diversos antibióticos que inibam a microbiota secundária sem afetar o crescimento de
4 *Brucella* spp. A bactéria cresce, na maioria das vezes, em presença de fucsina básica e é
5 inibida frente à tionina. As amostras de eleição para a tentativa de isolamento dessa bactéria
6 são membranas fetais, feto abortado, leite, swabs vaginais e sêmen (BEER, 1999; POESTER
7 et al., 2006).

8 O material coletado pode ser enviado congelado (-20°C) ao laboratório desde que
9 mantenha a temperatura durante o transporte. No caso de material proveniente de tecidos que
10 não seja oriundo de aborto, em função do pequeno número de bactérias viáveis, o diagnóstico
11 pode resultar em falso-negativo. Nestes casos, torna-se indicado o uso de meio de
12 enriquecimento suplementado como forma de melhorar a sensibilidade da técnica. O
13 enriquecimento com caldo triptose suplementado com a mistura de antibióticos de Farrell,
14 proporciona um aumento na taxa de isolamento de *Brucella* spp de amostras contaminadas na
15 ordem de 50%, mostrando-se uma ferramenta eficiente no diagnóstico da brucelose bovina
16 (MINHARRO et al., 2009).

17 Em meio sólido e condições ideais, uma cultura leva de três a sete dias para a
18 visualização das colônias, embora se recomende a incubação no mínimo por três semanas
19 (CARTER & CHENGAPPA, 1991). As colônias são pequenas, translúcidas, brilhantes,
20 convexas, de bordos arredondados e bem definidos e, geralmente, de coloração leitosa
21 (BATHKE, 1988). Uma vez isolada, *Brucella* spp. podem ser identificadas até gênero,
22 estudando-se suas características culturais, tintoriais, morfológicas e bioquímicas (NIELSEN,
23 1995).

24 A *Brucella* é uma bactéria gram negativa e cora-se bem por métodos tintoriais como
25 Ziehl-Neelsen e Koster modificados. À microscopia apresentam-se como bastonetes curtos,
26 isolados aos pares ou em pequenos grupos (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008),
27 apresentam características bioquímicas como a necessidade de carboidratos, algumas cepas
28 são catalase e oxidase positivas, não causam hemólise e muitas delas produzem urease, ácido
29 sulfídrico e reduzem nitrato a nitrito (RIBEIRO et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009).

30 Os avanços nas técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da
31 polimerase (PCR), fornecem novas ferramentas para o diagnóstico rápido de diversas
32 enfermidades, facilitando o diagnóstico direto de doenças infecciosas pela identificação do
33 ácido nucléico do agente (QUIEPO-ORTUNO et al., 1997).

1 Nesta reação utilizam-se genes alvos como: genes que codificam proteínas externas de
2 membrana (BAILEY et al., 1992; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; BARREIRA-SALDANÃ
3 et al., 1996; Da COSTA, 1996; FEKETE et al., 1990; GUARINO et al., 2000), seqüência de
4 gene *16S* rRNA (HERMAN; RIDDER, 1992), *16S-23S* região inter-gênica e genes funcionais
5 (DA COSTA, 1996), gene ligado a síntese do hormônio eritritol (BRICKER; HALLING,
6 1994) e seqüências de interseções (BRICKER; HALLING, 1994; OUAHANI-BETTACHE et
7 al., 1996; REDKAR et al., 2001). Estes ensaios têm sido aplicados para a detecção da bactéria
8 e identificação das espécies, com um limite de detecção de 10 a 100 fg de DNA genômico
9 bacteriano, equivalente a 10 a 7000 células por mL de sangue (LEAL-KLEVEZAS et al.,
10 1995; GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000) ou leite (LEAL-KLEVEZAS
11 et al., 1995; RIJENS et al., 1996; ROMERO, LOPEZ-GONI, 1999; LEAL-KLEVEZAS et
12 al., 2000; SREEVATSAN et al., 2000).

13 Além de superar as limitações do isolamento do agente por métodos tradicionais de
14 cultura do microorganismo, a PCR tem se popularizado na identificação de *Brucella* spp.,
15 especialmente quando utilizados materiais de abortos, sangue e sêmen (NOVAIS & PIRES
16 ALVES, 2004)

17 A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, qPCR-
18 tempo real) têm sido desenvolvidas e aplicadas no diagnóstico de diferentes patógenos (KIM
19 et al., 2007; LIM et al., 2008).

20 Ensaios por PCR convencional utilizando um par de oligonucleotídeo ou vários pares
21 (PCR-Multiplex) ou até mesmo um coquetel de oligonucleotídeos permitem a detecção de mais
22 de uma espécie ou biovars de *Brucella* (BRICKER; HALLING, 1994; BRICKER;
23 HALLING, 1995; EWALT; BRICKER, 2000; SREEVATSAN et al., 2000) ou ainda, a
24 diferenciação entre as amostras vacinais. Essas ferramentas são importantes para o
25 conhecimento detalhado da epidemiologia molecular da doença e podem ser aplicados em
26 programas de controle e vigilância da brucelose (Le FLÈHE et al., 2006).

27 PCR-AMOS é uma multiplex descrita pela primeira vez em 1994 que foi denominada
28 de acordo com as quatro espécies de *Brucella* que são possíveis de serem identificadas: A de
29 *B. abortus* (biovar 1, 2, e 4), M de *B. melitensis* (biovar 1, 2, e 3), O de *B. ovis* e S de *B. suis*
30 (biovar 1) (BRICKER & HALLING, 1994; BRICKER, 2002).

31 Esta multiplex baseia na detecção de repetições *in tandem* no elemento de inserção
32 711 (IS711), que é uma região exclusiva de *Brucella* spp., que pode variar em número de
33 cópias de acordo com as diferentes espécies e biovars (BRICKER, 1994).

1 Uma estratégia para a identificação e diferenciação de *B. abortus* RB51 amostras 2308
2 e cepa vacinal B19 foi realizada através do aprimoramento da técnica PCR-AMOS
3 desenhando um novo oligonucleotídeo relacionado ao locus na região gênica IS711 com uma
4 amplificação de um produto de 364pb referente a RB51/2308 (BRICKER, 1995) e a adição
5 dos oligonucleotídeo *ery1* e *ery2* para diferenciar *B. abortus* cepa vacinal B19 apresentando
6 uma deleção de 702 pares de base no gene eritritol (SANGARI et al., 1994) que reproduz um
7 fragmento de 567pb (BRICKER E HALLING, 1995).

8 Outro ensaio para diferenciação das espécies *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B.*
9 *neotomae* foi descrito por HINIC et al., (2008); estes ensaios são ferramentas adequadas tanto
10 para a aplicação em PCR convencional como na qPCR.

11 A qPCR é uma tecnologia aprimorada da PCR convencional e da utilização de
12 fluoróforos associada a utilização da tecnologia óptica e da informática , possibilitando o
13 monitoramento da reação a cada ciclo e a quantificação do fragmentos de DNA e RNA
14 (DUARTE, 2006; NEWBAY et al. 2003).

15 Esta técnica é de grande relevância para o diagnóstico de patógenos, doenças
16 genéticas, análises de polimorfismo e vem sendo utilizada como um método que apresenta
17 inúmeras vantagens, tais como a capacidade de fornecer resultados mais rápido do que a PCR
18 convencional, que necessita da eletroforese para observação dos resultados, e a utilidade
19 como ensaios quantitativos de DNA do patógeno na amostra (BELL; RANFORD-
20 CARTWRIGHT, 2002).

21 Além de ser altamente sensível e específica, pode ser usada na diferenciação de
22 espécies estreitamente relacionadas (O'MAHONY; HILL, 2002; RONDINI et al., 2003),
23 apresenta maior reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise e um melhor controle de
24 qualidade no processo, com menor risco de contaminação (NOVAIS & ALVES 2004).

25 Uma série de abordagens diferentes podem ser utilizadas para gerar o sinal de
26 fluorescência (NEWBAY et al., 2003). O método mais usado atualmente são os que utilizam
27 agentes intercalantes como o SYBR Green I (Invitrogen, EUA), no qual a fluorescência basal
28 aumenta mais de 20x quando o SYBR intercala ao DNA dupla fita, que é formado ao longo
29 da PCR. Este método possui um baixo custo e apresenta uma boa sensibilidade, podendo ser
30 utilizado tanto para quantificação quanto para diferenciação de espécies (PARASHAR et al.,
31 2006).

32 Outro sistema comumente utilizado é o *TaqMan*, que consiste em um par de
33 oligonucleotídeos iniciadores e uma sonda, utilizada para identificar sequências específicas de
34 amplicons durante a PCR. Estas sondas apresentam em uma extremidade um reporter e na

1 outra um *quencher*, que aceita energia do fluoróforo e a dissipa na forma de luz ou calor.
2 Durante a ciclagem da PCR estas sondas hibridizam com a sequência de DNA alvo
3 complementar, na fase de extensão ela é degradada e há um aumento da intensidade da
4 fluorescência (HOLLAND et al., 1991).

5 O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial e que
6 permite a quantificação da reação é denominado *Cycle Threshold* (C_q), sendo proporcional ao
7 número de cópias presente na amostra (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004). A quantificação
8 deste ponto é baseada na fluorescência emitida pela sonda ao ser hibridizada durante a ação da
9 Taq-DNA-polimerase, e quanto maior a quantidade inicial do alvo, mais rapidamente o
10 produto acumulado é detectado na reação e, conseqüentemente menor, o valor do C_q (Bricker,
11 2002).

12 A utilização de testes diagnósticos em rebanhos e principalmente em frigoríficos pode
13 fornecer dados importantes sobre a epidemiologia da doença, permitindo assim a detecção de
14 focos de doenças e a adoção de medidas de controle auxiliando assim na integração de
15 fiscalização da defesa sanitária com o serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal,
16 podendo ser considerada relevante para o sucesso das atividades propostas pelo PNCEBT
17 atuando tanto na proteção do consumidor quanto na vigilância epidemiológica (SILVA
18 JUNIOR, 2008)

19 Esta técnica com oligonucleotídeos iniciadores específicos pode vir a substituir a
20 caracterização bioquímica e a PCR convencional, permitindo principalmente o diagnóstico
21 rápido e preciso.

3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACHA, P. N.; SZYFRES B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals, Washington, D.C.: Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization, p.700, 1980.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales brucellosis. 3.ed. Washington: p.28-56, 2001.

ACHA, P. N.; SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed., Washington, Ed. Organización Panamericana de la Salud. 1986.

ADAMS, L. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary Microbiology*, v.90, p. 553-561, 2002.

ALTON, G. G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory, Paris: INRA, p.189, 1988.

ALVES, A. J. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.6-13, 2009.

ANDERSON, T. D.; MEADOR, V. P.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *B. abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Veterinary Pathology*, v.23, p.219-226, 1986.

ASHFORD, D. A. et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, p. 3435–3439, 2004.

AZEVEDO, S. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, supl. 1, p.19-26, 2009.

BARREIRA-SALDANÃ, H. A.; SIFUENTES-RINCÓN, A. M.; REVOL-DE MENDOZA, A. Diagnóstico de brucellosis por la reacción en cadena de la polimerasa. *Gaceta Medica de Mexico*, 132: 300-302, 1996.

BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsioses, micoplasmose. São Paulo: Roca, v.2, p.144-160, 1988.

BAILY, G. G. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *The Journal of Tropical Medicine and hygiene*, v.95, p. 271-275, 1992.

BEER, J. Doenças Infecciosas em animais domésticos. São Paulo: *Roca*, p 163-178, 1999.

BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Real Time quantitative PCR in parasitology. *Trends in parasitology*, v.18, n.8, p.337-42, 2002.

BLOOD, D. C.; RODOSTITS, O. M. Clínica Veterinária. 7 ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, p.570-579, 1991.

BOGDANOVICH, T. et al. Validated 5' Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 2261–2263, 2004.

BOUNAADJA, L. et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Veterinary Microbiology*, v.137, p. 156–164, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Boletim de defesa sanitária animal, Brasília: MAPA, v.30, n. 53-57, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/ DAS/ DAS. 2005.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). *Manual técnico*. Brasília, DF, p.184, 2006.

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

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

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

CAMPAÑA, R. C.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUKA, M. M. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo, 2003. http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm.

CAMPERO, C. M. Brucelosis en toros: una revisión. *Revue de médecine vétérinaire*, v.74, p.8-14, 1993.

CAMPERO, P. W. et al. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 24, p. 235–246, 1990.

CAMPOS, A. C. P. et al. Brucelose Bovina: prevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em reprodutores bovinos na microrregião de Goiânia. *Ciência Anim. Bras*, v.4, n.2, p.125-129, 2003.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *Journal of Infection*, v. 45, p. 122-127, 2002.

CARDOSO, P. G. et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, London, [online], v.5, n.13, mar. 2006 – Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435926/>. Acesso em: 10 Jan. 2011

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Brucella*. In: CARTER, G.R.; CHENGAPPA, (Eds.). *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4.ed. Philadelphia: *London*, p.196- 201, 1991.

CARVALHO NETA, A. V. et al.. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, v. 184, p.146–155, 2010.

CAVALLÉRO J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: Lemos, R.A.A. (ed.) *Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. p.536, 1998.

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, supl. 1, p.46-55, 2009.

COMERCI, D. J. et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, v. 33, p.159-168, 2001.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N. R.; HOLD, J. G. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wikins, p.377-388, 1984.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, p.89, 2006.

CORBEL, M. J. *Brucellosis: an overview*. In: International conference on emerging zoonoses, emerging infectious diseases. Jerusalem, v. 3, p. 213-221, 1997.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p.195-215, 1992.

CRAWFORD, R. P; HUBER, J. D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p.131-151, 1990.

DA COSTA, M. et al. or the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal Applied Bacteriology*. v.81, p.267-275, 1996.

DELRUE, R. M. et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiology*, v. 3, p. 487-497, 2001.

DIAS, J. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, supl. 1, p.66-76, 2009.

ENRIGHT, F. M. et al. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, v.45, p. 424-30, 1984.

ENRIGHT, F. M. The Pathogenesis of *Brucella* infection in domestic animals. In. NIELSEN, K.; Duncan, J.R. *Animal Brucellosis*. 1 ed., Ontario: CRC Press, 301-320, 1990.

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

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

FERRAZ, I. B. F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.4, p.504-508, 1999.

FERREIRA, A. J.; FERREIRA, C. Doenças infecto-contagiosas dos animais doméstico. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p 125-143, 1990.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p. 2688–2693, 2007.

FOSTER, J. T. et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus. *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, v.191, n.8, p.2864-2870, 2009.

GHANEM, Y. M. et al. Seroprevalence of camel brucellosis (*Camelus dromedarius*) in Somaliland. *Tropical Animal Health and Production*, v. 41 p.1779–1786, 2009.

GODFROID, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, v.36, p. 313-326, 2005.

GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 135-145, 2002.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, v.51, p. 296–305, 2010.

GODFROID, J. et al. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, v.102,1 p.18-31, 2011.

GONÇALVES, V. S. P. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, supl. 1, p.14-18, 2009.

GORHAM, S. L. et al. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Veterinary Pathology*, v.23, p. 331-2, 1986.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.281-297, 2002.

GUARINO, A. et al. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Veterinary Record*. v.147, p.634-636, 2000.

HAILESELASSIE, K.; SHEWIT AND MOSES, K. Serological survey of bovine brucellosis in barka and arado breeds (*Bos indicus*) of Western Tigray, Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 94, p. 28–35, 2010.

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*. *Journal of Bacteriology*, v.187, n.8, p.2715-2726, 2005.

HERMAN, L.; De RIDDER, H. Identification on *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology*. v.58, p.2099-2101, 1992.

HERRERA-LOPEZ, E. et al. Epidemiological study of brucellosis in cattle, immunized with *Brucella abortus* RB51 vaccine in endemic zones. *Vaccine*, v.28 , p. 59–63, 2010.

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. *Journal of Microbiological Methods*, v.75, p.375–378, 2008.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.191-195, 2003.

HOEDEN, J. V. D. *Zoonoses*. Amsterdam: Elsevier; 1964.

HOLLAND, M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.88, n.16, p.7276-7280, 1991.

HONG, P. C.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity*, v.68, p. 4102–4107, 2000.

HORVAT, R. T. et al. Ribosomal RNA sequence analysis of *Brucella* infection misidentified as *Ochrobactrum anthropi* infection. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n.3, p.1165-8, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária – Outubro de 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201002_publica.pdf. Acesso em 10 Mar. 2010.

JARDIM, G. C. et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.177-182, 2006.

KIM, C. et al. Development of TaqMan based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, p.837- 841, 2007.

KO, J.; SPLITTER, G. .A. Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p.65–78, 2003.

LAGE, A. P. et al. Programa nacional de controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.99-110, 2005.

LAGE, A. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LOBO, J. R. O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal em 2008. *Leite Integral*, v. 3, p.40-46, 2008.

LAMONTAGNE, J. et al. Proteomics-based confirmation of protein expression and correction of annotation errors in the *Brucella abortus* genome. *BMC Genomics*, p. 11, 2010.

LE FLÈCHE, P. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, v.6, p.9, 2006.

LEAL-KLEVEZAS, D. S. et al. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology*, v.75, p.91-97, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D. S. et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.3087–3090, 1995.

LEÓN, F. C. Brucelosis ovina y caprina. Paris: *Office International des Epizooties*, p.451, 1994.

LIM, S. Y. et al. Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, v.46, p.101-106, 2008.

LUCERO, N. E. et al. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*, v.52, p.883-7, 2003.

MANCILLA, M. et al. Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. *BMC Microbiology*, v.11, p.176, 2011.

MARQUES, D. C. Criação de bovinos. 7º Ed, Belo Horizonte. Revista Atualizada

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

MATOPE, G. et al. Herd-level factors for *Brucella* seropositivity in cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94, p.213–221, 2010.

MCCAUGHEY, W. J.; PURCELL, D. A. Brucellosis in bulls. *Veterinary Records*, v.93, p.336-337, 1973.

MCDERMOTT; ARIMI, J. J. and MCDERMOTT AND ARIMI, S. M. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.111–134, 2002.

McGIVEN, J. A. et al. *Journal of Immunological Methods*, v.278, n.1-2, p.171-8, 2003.

McGIVEN, J. et al. The improved specificity of bovine brucellosis testing in Great Britain. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p.38-40, 2008.

MAc MILLAN, A. Conventional serological tests, in *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press. 1990.

MEGID, J. et al. Avaliação das Provas de Soroaglutinação Rápida, Soroaglutinação Lenta, Antígeno Acidificado e 2Mercaptoetanol no Diagnóstico da brucelose Bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Reserch and Animal Science*, v.37, n.5, São Paulo. 2000.

MINAS, A. et al. Validation of fluorecence polarization assay (FPA) and comparison with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep. *Veterinary Microbiology*, v.111, p.211-221, 2005.

MINAS, A. et al. Validation of a fluorecence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests usedfor diagnosing *B. melitensis* infection in sheep and goats. *Journal of Immunological Methods*, v.320, p.94-103, 2007.

MINHARRO, S. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isolados de bovinos no Brasil (online). 2009. 77f. Tese (Doutorado em Ciencia Animal - Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufms.br/dspace/handle/1843/LGPD-7SUNFX>. Acesso: 20 Nov. 2011.

MOLNÁR, E. et al. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v. 22, n. 3, p. 117-121, 2000.

MOLNAR, L. et al. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 157-162, 1997.

MONTAGNARO, S. et al. Evaluation of a fluorecence polarization assay for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bulabalus bulbalis*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.125, p.135-142, 2008.

MONTEIRO, LARC. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, p. 217-222, 2006.

NASSAR, AM. Acordos bilaterais batem   sua porta. BeefPoit-RedeAgriPoint consultoria Ltda. 2010. Disponível em : [http:// <www.beefpoint.com.br/acordos-bilaterais-batem-a-nossaportanoticias6829415117.aspx.>](http://www.beefpoint.com.br/acordos-bilaterais-batem-a-nossaportanoticias6829415117.aspx) Acesso em: 12 jan. 2011.

NEWBY, D. T.; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5 2-exonuclease and hybridisation probe assay. *Applied and Environmental Microbiology*. v.69, p.4753–4759, 2003.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 5-9, 2002.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in veterinary science and comparative medicine.*, v.24, p.69-98, 1980.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Archivos de Medicina Veterinária*, v.27, p.9-17, 1995.

NIELSEN, K. et al. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of Immunological Methods*, v.195, p.161-168, 1996.

NIELSEN, K. et al. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.46, p.285-291, 1995.

NIELSEN, K. et al. Improved CELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, p.285-295, 1995.

NOVAIS, C. M.; ALVES-PIRES, M. PCR Tempo Real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.33, p.9-13, 2004.

O'CALLAGHAN, D. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, v.33, p.1210–1220, 1999.

OSTERMAN, I. M. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1173–1175, 2006.

O'MAHONY, J.; HILL, C. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*, v.51, p.283–293, 2002.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucelosis bovina. In: Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres. Seção 2.3, Cap. 2.3.1, p. 445-476, 2004.

OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2009.

OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4 Ed. Paris, France, p.276–291, 2000.

OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.417-424, 2002.

OUAHANI-BETTACHE, S.; SOUBRIER, M. P.; LIAUTARD, J. P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *Journal of Applied Bacteriology*, v.81, p.154–160, 1996.

PALHANO, J.; INÊS, F.; MOREIRA, A. Reprodução em bovinos e Fisiopatologia Terapêutica, Manejo e Biotecnologia. 1º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.66-67, 2003.

PAPPAS, G. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, v.6, p.91–99, 2006.

PARASHAR, D. et al. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian Journal of Medical Research*, v.124, p.385–398, 2006.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. 1ª ed., Jaboticabal, Ed. Funep. 2003.

PAULIN, L. M. et al. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. O Combate à brucelose bovina. Situação Brasileira. Jaboticabal: FUNEP p.154, , 2003.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Medicina Interna , Lisboa [online], v.10, n. 2, p. 91-100, 2003. Disponível em: <<http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

POESTER, F. P. Vacinas contra brucelose: Passado, presente e futuro. In: 50th Anniversary, Meeting Of Brucellosis Research Conference, p.8-9, 1997.

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

POESTER, F. P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.25, p.5327-34, 2006.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E; LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v.47, p.13-29, 2005.

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.1-5, 2009.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I. et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.2927-2930, 1997.

RADOSTITS, O. M. et al. Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos. 9.ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, p.1737, 2002.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte. v. 32, n. 2, p. 83-92, 2008.

RIJPENS, N. P. et al. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.1683–1688, 1996.

REDKAR R., S. ROSE, B. BRICKER AND V. DEL VECCHIO. Realtime detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Prob.* 15: 43 52, 2001.

ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I. Melhor método para a purificação do DNA bacteriano a partir de leite bovino para a detecção de *Brucella* spp. pela PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.3735-7, 1999.

RONDINI, S. et al. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.4231–4237, 2003.

ROOP, R. M. et al. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical Microbiology and Immunology*, v.198, p.221-238, 2009.

RUIZ-MESA, J. D. et al. Diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clinical Microbiology and Infection*, v.11, p.221-5, 2005.

RUSSEL, A. D.; YARNICH, V. S.; KOULIKOVSKII, A. V. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Genève: WHO, p.61, 1984.

SAMAHA, H. et al. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, p.1916-8, 2008.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.19, p.55-63, 1996.

SAMARTINO, L. et al. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *Revista Brasileira de medicina veterinária*, B.Aires, v.82, n.2, p.90-94, 2000.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology*, v.146, p.487-495, 2000.

SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Identificação de *Brucella abortus* cepa da vacina B19 pela detecção de polimorfismo de DNA no locus ery *Vaccine*, v.12, p.435-8, 1994.

SANTOS, R. L. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.83-98, 2005.

SAURET, J. M.; VILISSOVA, N. Human brucellosis. Related citations. *Journal of the American Board of Family Practice*, v.15, p. 401-6, 2002.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates—first report. *Journal of Medical Primatology*, v.38, p.70-73, 2009.

SCHLAFER, D. H.; MILLER, R. B. Female genital system. In: MAXIE, M. G (ed.) *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, v.3, p.429 -564, 2007.

- SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.375-382, 2008.
- SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.801-808, 2010.
- SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.392–398, 2010.
- SELEEM, M. N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *Microbiology Letters*, v.294, p.24-31, 2009.
- SIEIRA, R. et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.849–855, 2000.
- SILVA JUNIOR, F. F. Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigorífico pela sorologia, bacteriologia e PCR. Tese (Doutorado em Saúde Animal e Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campos Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 64 f, 2008.
- SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, supl. 1, p.103-108, 2009.
- SMITH, R. et al. Induction of lymphocyte responsiveness by the outer membrane-peptidoglycan complex of rough strains of *Brucella abortus*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v.26, p.31-48, 1990.
- SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2602-2610, 2000.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, p.180, 1999.
- TILLER, R. V. et al. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, p.5837–5845, 2010.

TISOLIS, R. M. Comparative genome analysis of the α -proteobacteria: Relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proceeding of the Nacional Academy of Sciences*, v.99, p.12503-12505, 2002.

TRICHARD, C. J. et al. Unilateral orchitis in a bull caused by *Brucella abortus* biotype 1. *Journal of South African Veterinary Association*, v.53, p.60–62, 1982.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CORTES, J. A. Bases para prevenção da brucelose bovina. *Comunicado Científico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Univ. São Paulo, v.11, p.25-36, 1987.

VEJARANO RUIBAL, M. D. P. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo. Disponível em: <http://www.tese.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13072009-111831/pt-br.php>. Acesso em: 26 agos. 2011.

VERGER, J. M. et al. La brucellose bovine h *Brucella melitensis* en France. *Annals of Veterinary Research*, v.20, p.93–102, 1989.

VERGER, J. M. et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.35, p. 292–295, 1985.

VIZCAÍNO, N. et al. Minor nucleotide substitutions in the OMP31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infection and Immunity*, v.69, p.7020-7028, 2001.

WATTAM, A. R. et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology*, v.191, p.3569–79, 2009.

XAVIER, M. N. et al. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. *Jornal of Comparative Pathology*, v.140, p.149-15, 2009.

ZINSSTAG, J. et al. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.527–531, 2007.

IDENTIFICAÇÃO DE *Brucella* spp. POR TÉCNICAS MOLECULARES EM CARCAÇAS DE BOVINOS COM LESÕES SUGESTIVAS DE BRUCELOSE

Irene Elisei Novaes Lauria, Cleber Oliveira Soares, Cristiane Camargo Sanches,
Carina Elisei de Oliveira, Carlos Alberto Nascimento Ramos, Renata Cunha Madureira,
Grácia Maria Soares Rosinha*

*Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. BR 262, km 4, CEP 79.002-970,
Campo Grande, MS; Telefone: +55 (67) 3368-2168; E-mail: rosinha@cnpqc.embrapa.br

Periódico: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

RESUMO

Objetivou-se neste estudo verificar a eficiência das técnicas moleculares PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR), como diagnóstico de bovinos que apresentavam lesões sugestivas de brucelose abatidos em frigoríficos do estado de Mato Grosso do Sul. Para isso, foram utilizadas amostras (pulmão, fígado, músculo, linfonodos, ligamento cervical) de 20 animais sendo estas seccionadas, processadas e inoculadas em meio de cultura seletivo *Trypticase Soy Agar* (TSA) e *Trypticase Soy Broth* (TSB) suplementados com antimicrobiano de Farrel para o isolamento de *Brucella* spp. As colônias de bactérias obtidas, tanto em meio líquido, quanto em sólido tiveram seu DNA genômico extraído, inativados e submetidos à PCR convencional utilizando oligonucleotídeos para o gene *bcps31*, com o intuito de identificar as bactérias referentes ao gênero *Brucella* obtendo uma prevalência amostral de 95% (19/20) positivas crescidas em meio líquido e 75% (9/12) positivas crescidas em meio TSA. As amostras positivas, para o gênero *Brucella*, crescidas em meio sólido TSA, foram submetidas à multiplex PCR AMOS aprimorada para identificação de espécies de *Brucella* obtendo assim amostras isoladas de *B. abortus* (biovar 1, 2 e 4) e cepa vacinal B19. Também foi possível identificar animais positivos para *Brucella* utilizando DNA de amostras de sangue na PCR convencional realizada com os oligonucleotídeos *bcps31* apresentando uma prevalência de 30% (6/20) e para os oligonucleotídeos *BruAb_0168*, específico para *B. abortus*, obteve-se 90% (18/20) das amostras positivas. Na qPCR utilizando estes mesmos DNA's de sangue e o oligonucleotídeo *BruAb_0168* houve uma prevalência de 95% (19/20) das amostras positivas para *B. abortus*. Conclui-se que, técnicas como PCR convencional e qPCR utilizando amostras de sangue total de bovinos abatidos em frigorífico com lesões sugestiva, mostrou-se eficiente na detecção de animais positivos para Brucelose, podendo assim ser disponibilizado ao MAPA como um método sensível e específico que os atuais utilizados.

Palavras - chave: *Brucella* spp., Diagnóstico, PCR Convencional, PCR em Tempo Real.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas que acometem os seres humanos, animais domésticos e silvestres (Godfroid et al. 2005; Acha & Szyfres 2003). Em bovinos a doença é causada principalmente pela espécie *Brucella abortus*, sendo o aborto sua principal característica devido à grande replicação das bactérias no trofoblasto placentário. A morte e expulsão fetal ocorrem entre o sexto e o oitavo mês de gestação e a persistência da bactéria nos macrófagos leva à infecções crônicas (Roop et al. 2009).

Além de *B. abortus* em bovinos, outras nove espécies de *Brucella* já foram classificadas, sendo que a denominação é de acordo com o hospedeiro de onde estas foram isoladas: *Brucella melitensis* em caprinos; *Brucella ovis* em ovinos; *Brucella suis* em suínos; *Brucella neotomae* em ratos do deserto; *Brucella canis* em canídeos (Corbel; Brinley-Morgan 1984); *Brucella ceti* em golfinhos e baleias; *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos (Foster et al. 2007); *Brucella microti* no roedor *Microtus arvalis* (Scholz et al. 2008); e *Brucella inopinata* em humanos (Scholz et al. 2010).

O isolamento e identificação da bactéria são testes diretos e considerados como padrão ouro, porém é muito complexo devido às exigências de crescimento de *Brucella* spp. (Minharro 2009).

Avanços nas técnicas de biologia molecular fornecem novas ferramentas para o diagnóstico rápido de diversas enfermidades. A PCR e suas variantes (PCR multiplex, PCR em tempo real) têm sido desenvolvidas e aplicadas no diagnóstico de diferentes patógenos (Kim et al. 2007; Lim et al. 2008) e inclusive para identificação de *Brucella* spp., especialmente quando utilizados materiais de abortos, sangue e sêmem (Quiapo-Ortuno et al. 1997).

Ensaio por PCR utilizando um par de oligonucleotídeos ou vários pares (PCR-Multiplex) permitem a detecção de mais de uma espécie ou biovars de *Brucella* (Bricker & Halling 1994; Bricker & Halling 1995; Ewalt & Bricker 2000; Sreevatsan et al. 2000) ou ainda, a diferenciação entre as amostras vacinais. A PCR-AMOS (AMOS significa as iniciais das quatro espécies de *Brucella* que são identificadas por este teste) é uma PCR-multiplex

1 desenvolvida para a identificação e diferenciação de quatro espécies de *Brucella*: *B. abortus*
2 (biovar 1, 2, e 4), *B. melitensis* (biovar 1, 2, e 3), *B. ovis* e *B. suis* (biovar 1) (Bricker 2002;
3 Bricker & Halling 1994), cepa selvagem 2308 e as cepas vacinais B19 e RB51 (Bricker &
4 Halling 1995).

5 A qPCR (PCR em Tempo Real) , além de ser mais sensível e específica, tem a
6 vantagem de identificar o DNA bacteriano em pequenas quantidades em amostras clínicas em
7 um curto período de tempo, quando comparado à PCR convencional (Stralin et al. 2006;
8 Markoulatos et al. 2000; Bounaadja et al. 2009).

9 Assim, com este estudo, objetivou-se verificar a eficiência das técnicas moleculares
10 PCR convencional e qPCR, utilizando o sangue de bovinos abatidos em frigorífico com lesões
11 sugestivas para brucelose, a fim de disponibilizar ao MAPA um método mais rápido, sensível
12 e específico que os atuais utilizados.

13

14

MATERIAL E MÉTODOS

15 *Amostras* – Foram utilizadas amostras de pulmão, fígado, músculo, linfonodos,
16 ligamento cervical e sangue (coletado da artéria braquiocefálica) de 20 bovinos, abatidos em
17 frigorífico, sob Inspeção Federal, que apresentavam lesões sugestivas de brucelose (Figura 1),
18 provenientes de diversas propriedades do Estado de Mato Grosso do Sul, no período de
19 Agosto de 2008 à Abril de 2010.

20 *Amostras padrão* - As amostras de *B. abortus* B19, *B. abortus* RB51, *B. abortus* 544,
21 *B. ovis*, *B. suis* biovar 1, *B. melitensis* biovar 1, inativadas por calor, foram gentilmente
22 cedidas pelo MsC. Paulo Martins Soares Filho do Laboratório Nacional Agropecuário de
23 Pedro Leopoldo, MG (LANAGRO-MG/MAPA).

24 *Processamento e cultivo microbiológico das amostras* - As amostras clínicas foram
25 identificadas e mantidas a -80°C no Laboratório de Engenharia Genética Animal da Embrapa
26 Gado de Corte e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia Aplicada, no
27 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Federal de Minas Gerais,
28 Belo Horizonte, onde foram processadas. As amostras foram retiradas do freezer 24 horas
29 antes, e descongeladas lentamente em geladeira. Os tecidos foram colocados em bandejas

1 estéreis e dissecados com auxílio de tesouras e pinças. Animais que continham mais de uma
2 amostra coletada, foi realizado um homogeneizado dessas e feito um “*Pool*”, formando uma
3 só amostra. Fragmentos de aproximadamente 1cm³ foram colocados em placas de Petri
4 descartáveis. Em seguida, foram transferidos para sacos de homogeneização e acrescidos de
5 cerca de 100 mL de PBS 1X estéril. Foram homogeneizados usando *stomacher* (Modelo MC
6 1204, ITR, Brasil) por 5 minutos com 400 golpes/minutos e 100 µL destes foram semeados
7 no meio de cultura seletivo sólido, Trypticase Soy Agar (TSA) e líquido, Trypticase Soy
8 Broth (TSB) (Alton et al. 1988; OIE 2004). Os materiais utilizados como meio de cultura
9 foram suplementados com antimicrobianos de Farrell (*Brucella* Selective Supplement
10 SR0083A, Oxid, UK) (FARRELL 1974) e anflotrinina 0,1mg/mL.

11 As placas e tubos foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Paralelamente,
12 amostras do homogeneizado obtidas no *stomacher* foram estocadas em criotubos e
13 armazenadas em freezer -80 °C. Em seguida, 1 mL do homogeneizado foi centrifugado a
14 14000 xg por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado
15 em 100 µL de tris EDTA (TE) (10mM Tris HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8,0). As amostras
16 foram inativadas em banho-maria a 85°C por 2 horas. Após a inativação este material foi
17 armazenado para posterior extração de DNA genômico.

18 *Obtenção das colônias de Brucella spp.* - A cada 48 horas, durante sete dias, as placas
19 foram visualizadas para verificar se houve crescimento de colônias bacterianas. Casos em que
20 não houve crescimento bacteriano, novas placas contendo meio TSA foram inoculadas com
21 200 µL do caldo TSB mantido em crescimento durante 7 dias e novamente observadas pelo
22 mesmo período para a verificação de crescimento de colônias.

23 Das colônias de *Brucella spp.* isoladas, foi realizada cultura em meio TSB e parte
24 desta cultura foi armazenadas em meio de congelamento em criotubos e estocadas em freezer
25 -80 °C. A outra parte foi transferida para tubos do tipo eppendorf contendo 1mL de PBS 1X.
26 Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 xg por 5 minutos. Após o sobrenadante
27 foi descartado, o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de TE e posteriormente as amostras
28 foram inativadas em banho maria a 85 °C por 2 horas para posterior extração de DNA.

29 *Extração de DNA genômico* - Culturas das colônias isoladas, com morfologia
30 sugestiva de *Brucella spp.*, do caldo e das cepas padrão de *Brucella spp.*, todas inativadas,
31 foram submetidas a extração de DNA conforme descrito por Picher et al. (1989).

1 Para a extração de DNA de sangue, foram utilizados 300µL das amostras e
2 acrescentados 500µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20% homogeneizado por inversão e
3 incubado a 65 °C por 60 minutos. Foi adicionado 800µL de clorofórmio e agitado
4 vigorosamente em vortex, em seguida foi adicionado 400µL da solução de precipitação
5 protéica (3M C₂H₃KO₂, 2M CH₃COOH) e homogeneizados novamente. As amostras foram
6 centrifugadas a 14000 xg por 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e
7 tratado com 1mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão até formar um
8 precipitado. As amostras permaneceram à temperatura de -20°C por 12 horas. Após esse
9 período as amostras refrigeradas foram centrifugadas a 14000 xg por 5 minutos, só o
10 sobrenadante foi descartado e ao sedimento formado foi adicionado 1mL de etanol 70%. Logo
11 após, as amostras foram centrifugadas a 14000 xg/5 min. e o sobrenadante descartado. Os
12 sedimentos foram secos em temperatura ambiente e ressuspensos em 50µL de TE e
13 estocados a -20°C. A concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas em
14 espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de
15 agarose, corado com Syber Gold (Invitrogen) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

16 *PCR convencional* – Para as reações de PCR com o DNA extraído do caldo, da cultura
17 das colônias isoladas e do sangue total foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos
18 descritos na Tabela 1. Para a identificação de *Brucella* spp. utilizou-se o par de
19 oligonucleotídeos bcps31 referente ao gene BCPS da bactéria do gênero *Brucella*, conforme
20 Bailly et al. (1992).

21 Foi realizada a PCR do DNA de caldo e sangue com os oligonucleotídeos
22 BruAb_0168, referente ao gene específico à *Brucella abortus* (BruAb_0168) amplificando um
23 fragmento de 81pb descrito por Hinic et al. (2008).

24 A técnica PCR-AMOS foi realizada com o DNA extraído das culturas das colônias
25 isoladas em meio TSA positivas para a PCR com os oligonucleotídeos bcps31. A reação e
26 termociclagem foram realizadas seguindo os mesmos padrões de Bricker & Halling (1995).

27 As análises dos produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de
28 agarose 1% (bcps31 e AMOS) e 3% (BruAb_0168), corados com brometo de etídeo e
29 visualizados em transiluminador ultravioleta.

30 *PCR em tempo real* – Esta técnica foi utilizada para as amostras de DNA de sangue.
31 As reações foram realizadas em duplicata em volume final de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de

1 Platinum® SYBR® Green/Rox 2x (Invitrogen, EUA), 5pmoL de cada oligonucleotídeo
2 iniciador e aproximadamente 50 ng de DNA genômico extraído de sangue. A termociclagem
3 foi realizada em termociclador StepOne Plus (Applied Biosistmes) de acordo com Hinic et al.,
4 (2009).

5 Para a avaliação e quantificação das amostras foi construída uma curva padrão a partir
6 de DNA extraído de cultura em meio TSA da cepa de referência selvagem 2308 de *B.*
7 *abortus*. A amostra de DNA foi extraída e quantificada por espectrofotometria em Nanodrop
8 (ND1000 Thermo Scienific) e o número de cópias de DNA por µL foi determinado conforme
9 descrito por Ke et al. 2006, utilizando a fórmula:

$$10 \quad \frac{6 \times 10^6 \text{ (cópias/mol)} \times \text{concentração(g/}\mu\text{l)}}{\text{Massa molar (g/mol)}} = \text{(cópias/}\mu\text{l)}$$

11

12 A partir da cepa de referência foram realizadas diluições seriadas em concentrações
13 variando de 1×10^6 à 1×10^1 cópias de DNA/µL. Todas as reações foram realizadas em
14 duplicata.

15 Como controle positivo nas reações, utilizou-se DNA extraído da cepa de referência
16 selvagem 2308 de *B. abortus*. Como controle interno da reação, utilizou-se água livre de
17 nucleases.

18 Para a confirmação da especificidade da reação, quatro animais negativos de
19 brucelose provenientes de uma propriedade certificada pelo MAPA/Brasil como livre de
20 Brucelose e Tuberculose, foram utilizados como controle negativo e avaliados por qPCR.

21 *Análises estatísticas* – As PCR convencionais realizadas com os oligonucleotídeos
22 iniciadores bcps31 e BruAb_0168, utilizados tanto com o DNA extraído de sangue como o
23 DNA do caldo em meio TSB, foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado. Além da
24 comparação entre as PCR convencionais, este teste também foi aplicado a fim de comparar as
25 PCR convencionais com qPCR utilizando o DNA extraído de sangue.

26

27

RESULTADO E DISCUSSÃO

Das 20 amostras cultivadas em meio TSB, foi possível observar crescimento bacteriano em 100% das amostras, porém quando cultivadas em TSA este crescimento bacteriano foi de 60% (Tabela 3). Segundo Waltman (2000), a utilização de meio líquido enriquecido, por fornecer nutrientes necessários e suficientes para o restabelecimento das células bacterianas danificadas, pode facilitar o isolamento de microorganismos como *Brucella abortus*, podendo assim justificar a alta eficiência do meio TSB, em comparação ao meio TSA.

A execução da técnica de isolamento possui certa dificuldade em função das espécies de *Brucella* serem fastidiosas e exigirem meios ricos em nutrientes para o seu crescimento e isolamento primário. A sensibilidade desta técnica também pode estar correlacionada diretamente com a natureza da amostra e com o número de bactérias viáveis na mesma (Alton et al. 1988), outro fator importante que pode interferir no isolamento da bactéria é o processo de congelamento das amostras que pode contribuir para uma situação de estresse da bactéria permitindo assim a diminuição da sua viabilidade (Waltman 2000).

No Brasil, poucos são os estudos que visam identificar as espécies e biovars de *Brucella* que acometem os bovídeos, entretanto já foram identificadas *B. abortus* biovars 1, 2 e 3 e *B. suis* biovar 1 acometendo estes hospedeiros (BRASIL 2006).

Bovinos e bubalinos são susceptíveis às espécies *B. suis* e *B. melitensis*, embora a espécie mais prevalente é *B. abortus*, que apresenta oito biovars (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19) que são diferentes quanto à virulência, patogenicidade e importante para os estudos epidemiológicos moleculares (Acha; Szyfres 1986; Paulin; Ferreira Neto 2003).

O isolamento é o método de considerado como “padrão ouro”, para a identificação das espécies de *Brucella* por apresentar uma alta especificidade (Lage et al. 2008) e classicamente a detecção e identificação de *Brucella* spp. e biovars são baseadas na análise da morfologia colonial e identificação bioquímica das colônias isoladas. Embora as informações sejam altamente validadas, este método exige tempo, mão de obra experiente e laboratório especializado de segurança nível 3 (HERMAN & DERIDDER, 1992).

1 Neste estudo foi realizada a identificação das espécies de *Brucella* pela técnica
2 AMOS-PCR das amostras obtidas por isolamento da bactéria em meio TSA a partir de lesões
3 sugestivas para brucelose. As amostras foram identificadas como positivas para *Brucella*
4 *abortus* biovar (1, 2 ou 4) e para cepa vacinal B19 sem nenhuma utilização de testes
5 bioquímicos.

6 Em 1992, Baily e colaboradores realizaram um estudo baseado no gene *bcps*,
7 utilizando o teste de PCR convencional com um único par de oligonucleotídeos apresentando
8 uma boa especificidade, ao permitir a diferenciação de *Brucella* spp. de outros patógenos
9 gram-negativos.

10 Neste estudo quando analisado o DNA extraído de colônias isoladas em meio TSA,
11 pela técnica de PCR convencional, utilizando os oligonucleotídeos *bcps31*, foi possível
12 constatar que 75% (9/12) apresentaram uma amplificação de 232 pb, confirmando que as
13 mesmas são pertencentes ao gênero *Brucella*.

14 Dessas colônias positivas para os oligonucleotídeos *bcps31*, foi realizada a técnica
15 AMOS-PCR desenvolvida por Bricker e Halling (1994). Este ensaio multiplex é capaz de
16 diferenciar *Brucella* em nível de espécies. Este teste é espécie-específico correspondendo a
17 identificação de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* e *Brucella suis* (AMOS) e
18 baseia-se no local de inserção do elemento IS711. Esses mesmos autores aprimoraram esta
19 técnica adicionando oligonucleotídeos capazes de diferenciar animais naturalmente infectados
20 com as cepas vacinais B19 e RB51 Bricker e Halling (1995).

21 Foi possível constatar que 66,66% (6/9) apresentaram-se positivas para *B. abortus*
22 (biovars 1, 2 ou 4), quando amplificaram dois fragmentos (498 pb referente a *B. abortus* e
23 178 pb que corresponde ao gene *ery*); 22,22% (2/9) apresentaram-se positivas para a cepa
24 vacinal B19, amplificando apenas um fragmento de 498 pb e 11,11% (1/9) foram negativos
25 para *Brucella* (figura 2).

26 Com este estudo foi possível identificar em dois animais com lesão sugestiva para
27 Brucelose, por meio da PCR-AMOS, a cepa vacinal B19, sendo que um desses animais
28 também foi possível isolar e identificar a cepa selvagem *B. abortus*. Uma das hipóteses para o
29 isolamento da amostra vacinal pode ser devido ao erro na aplicação da vacina, como:
30 vacinação após 8 meses de idade, doses elevadas, animais com baixo estado imunológico,
31 entre outras (Shurig et al. 2002).

1 Para analisar as amostras de caldo obtidas dos 20 animais, o DNA extraído destas foi
2 analisado pela técnica de PCR convencional utilizando os oligonucleotídios bcps31 e
3 BruAb_0168. Das
4 PCRs com o oligonucleotídeo bcps31 foi possível constatar que 95% das amostras (19/20)
5 apresentaram uma amplificação de 223 pb, confirmando que as mesmas são pertencentes ao
6 gênero *Brucella*. Quando utilizado o oligonucleotídeo BruAb_0168 foi possível constatar que
7 100% (20/20) amplificaram o fragmento de 81pb, mostrando-se positivas para a presença de
8 *B. abortus*.

9 Quando analisado o DNA extraído de sangue dos 20 animais, pela técnica de PCR
10 convencional utilizando o oligonucleotídeo bcps31 foi possível observar que 30% (6/20) dos
11 animais foram positivos, amplificando o fragmento de 223pb (Figura 3). Porém, quando
12 utilizando os oligonucleotídios BruAb_0168, 90% (18/20) dos animais apresentaram-se
13 positivos para *B. abortus*, amplificando um fragmento de 81pb (Figura 4) apresentando uma
14 diferença significativa ($p < 0,0001$) entre estes testes.

15 Uma possível explicação para a diferença significativa dos oligonucleotídios utilizados
16 na PCR convencional para as amostras de sangue é o tamanho do produto amplificado por
17 eles e da bacteremia de cada animal. O oligonucleotídeo bcps31 amplifica um produto de
18 223pb, já o BruAb_0168 amplifica um produto de apenas 81pb. Essa diferença pode ser
19 responsável pelo aumento da sensibilidade do oligonucleotídeo BruAb_0168. Embora um
20 estudo realizado no Egito, em 2009, por El Kholy e colaboradores, utilizando a PCR com o
21 oligonucleotídeo bcps31 para DNA extraído de sangue de humanos, com suspeita de
22 brucelose, mostrou que a técnica apresentou alta sensibilidade e especificidade.

23 Neste estudo o oligonucleotídeo bcps31 não se mostrou tão eficaz na detecção do
24 patógeno pela PCR utilizando DNA extraído de sangue em comparação ao oligonucleotídeo
25 BruAb_0168, descrito por Hinic et al (2008), que desenhou este oligonucleotídeo baseado na
26 inserção do elemento IS711, estável em número e posição, sendo ele utilizado para uma
27 detecção rápida, sensível e precisa para *B. abortus*.

28 As reações de qPCR foram realizadas neste estudo com o oligonucleotídeo
29 BruAb_0168, utilizando-se o DNA extraído do sangue total dos animais. As amplificações
30 resultaram em fragmentos de DNA com temperatura média de dissociação (T_m) de 84,42°C

1 e mostrou-se sensível detectando 95% (19/20) dos animais positivos, e apenas um animal
2 negativo (Figura 5).

3 Para a confirmação da especificidade da reação, foram utilizados na qPCR quatro
4 animais provenientes de uma propriedade certificada pelo MAPA como livre de Brucelose e
5 Tuberculose. Todos os animais apresentaram negativos (Figura 6) confirmando assim a
6 especificidade da técnica e do oligonucleotídeo BruAb_0168.

7 Seónadh et al. (2006) realizaram um estudo avaliando o método convencional e qPCR
8 para detecção de *B. abortus* em amostras de sangue, leite e linfonodo de vacas naturalmente
9 infectadas. O sangue não se mostrou uma amostra ideal para a detecção deste patógeno. Não
10 foi encontrada nenhuma vantagem no uso da qPCR sobre os métodos convencionais
11 sorológicos e bacteriológicos.

12 Já neste estudo a utilização da amostra de sangue para a realização da qPCR mostrou-
13 se eficaz, embora esta técnica não apresentou uma diferença significativa ($p=0,5483$) em
14 relação a utilização desta mesma amostra na técnica de PCR convencional. No entanto a
15 qPCR é mais vantajosa, com relação a PCR convencional, devido ao menor tempo utilizado
16 para realizar sua reação e principalmente por gerar resultados quantitativos possibilitando
17 assim a estimativa da bacteremia do animal e por ser uma técnica menos laboriosa (Queipo-
18 Ortuño et al. 2009).

19 Ao identificar as 20 amostras provenientes de diferentes frigoríficos, foi possível
20 constatar uma variação nos resultados encontrados pelos diferentes testes (Tabela 3) porém,
21 embora houvesse essa variação, foi possível observar que a espécie *Brucella abortus* foi a que
22 apresentou a maior prevalência amostral, validando, desta forma, os achados descritos
23 anteriormente no país e no mundo (Godfroid et al. 2011; Poester et al. 2002).

24 Os resultados têm sido sempre variáveis quando comparado com sorologia e
25 bacteriologia. Pode haver um número de razões pelas quais o ensaio de PCR para *B. abortus*
26 ainda não superou os métodos sorológicos e bacteriológicos. O estágio da infecção pode
27 influenciar o número e localização de bactérias e a presença de grandes quantidades de DNA
28 genômico bovino pode ter inibição que afeta no ensaio de PCR (Seónadh et al. 2005).

1 O método de extração de DNA bacteriano em amostras de sangue de bovinos, pode ser
2 crucial para a capacidade de detectar *Brucella* pela técnica de PCR, devido a baixa quantidade
3 UFC/mL contido neste material (AL-AJLAN et al. 2011).

4 Com a realização da curva padrão (Figura 7) foi possível a quantificação da
5 bacteremia por qPCR utilizando SYBR GREEN de 9 animais avaliados (Tabela 3) por meio
6 da amplificação do produto específico (Figura 7). Provavelmente, devido à erros de
7 manipulação, não foi possível a quantificação de 10 animais (Figura 8).

8 Conclui-se que, técnicas de biologia molecular como PCR convencional e qPCR
9 utilizando amostras de sangue total de bovinos abatidos em frigorífico com lesões sugestiva,
10 mostrou-se eficiente na detecção de animais positivos para Brucelose, podendo assim ser
11 disponibilizado ao MAPA como um método mais rápido, sensível e específico que os atuais
12 utilizados.

13

AGRADECIMENTOS

14 Agradecemos ao apoio financeiro da EMBRAPA Macroprograma 3 (processo
15 03.08.01.004.00.00), ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
16 CNPq – Edital CNPq/MAPA/SDA Nº 64/2008 e a equipe do Laboratório de Bacteriologia
17 Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – UFMG

18

REFERÊNCIAS

- Acha PN, Szyfrs B 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed., Washington, Ed. Organización Panamericana de la Salud.
- Acha PN, Szyfres B 2003. Zoonoses and communicable diseases commom to man and animais. Washington: OPAS 3: 544p.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM 1988. Techniques for the brucellosis laboratory, Paris: INRA 189p.
- Al-Ajlan HH, Ibrahim ASS And Al-Salamah AA 2011. Comparison of Different PCR Methods for Detection of *Brucella* spp.in Human Blood Samples. *Pol. J. Microbiol.* 60:27-33p
- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG., 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95: 271–275.
- Bounaadja L, Albert D, Chenais B, Henault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet. Microbiol.*137: 156–164.
- Brasil 2006. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Manual técnico. Brasília, DF, 184p.
- Bricker BJ 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol* 90: 435–446.
- Bricker BJ and Halling SM 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33: 1640–1642.
- Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S 2000. Molecular characterization of *Brucella* trains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 38: 1258–1262.
- Bricker BJ, Halling SM 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella militensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 2660-2666.
- Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ 1984. Genus *Brucella*. In: Krieg NR, Hold JG (Ed.) Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wikins 377-388.
- El Kholy AA, Gomaa HE, El Anany MG, Abd El Rasheed E 2009. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. *East Mediterr Health J.* 15: 1068-74.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A 2007. *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.
- Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ 2005. From the discovery of the Malta fever´s agent to the discovery of a

- marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36: 313-326.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Waltmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Dahouk ALS, Neubauer H, Letesson J-J 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med.* 1: 118-31.
- Hinić V, Brodard I, Thomann A, Cvetnić Ž, Makaya PV, Frey J, Abril C 2008. 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: 2008 375–378.
- Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I 2007. Development of TaqMan based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg* 77: 837- 841.
- Lage AP, Gonçalves VSP, Lobo JR 2008. O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal em 2008. *Leite Integral* 3: 40-46.
- Lim SY, Kim BJ, Lee MK, Kim K 2008. Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of Mycobacterium species. *Lett Appl Microbiol* 46: 101-106.
- Minharro S 2009. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isolados de bovinos no Brasil. Tese (Doutorado em Ciencia Animal - Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 77f.
- OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucelosis bovina 2004. In: Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres. Seção 2.3, Cap. 2.3.1, p. 445-476.
- Ouahrani S, Michaux S, Widada J S, Bourg G, Tournebize R and Liautard JP 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp. : relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3265-3273.
- Paulin L M, Ferreira-Neto J S 2003 O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. 1a ed., Jaboticabal, Ed. Funep.
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8: 151-156.
- Poester Fp, Gonçalves U Sp, Lage Ap 2002. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol* 90: 55-62.
- Poester Fp, Samartino Le, Lage Ap 2005. Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, v.47, p. 13-29.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bermudez P, Bravo MJ, Morata P 2009. Rapid Differential Diagnosis between Extrapulmonary Tuberculosis and Focal Complications of Brucellosis

Using a Multiplex Real-Time PCR Assay. PLoS ONE 4(2): e4526.
doi:10.1371/journal.pone.0004526.

Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35: 2927-2930.

Roop RM 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 198: 221-238.

Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nöckler K 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 375-382.

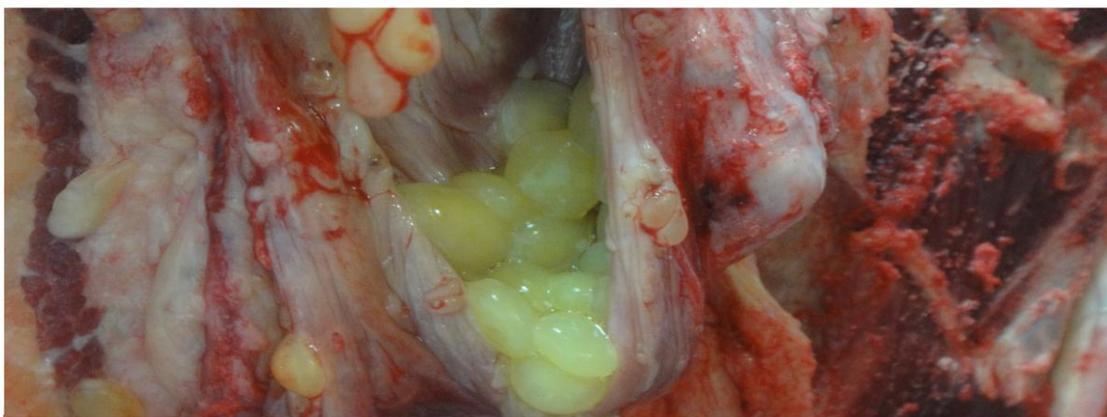
Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 801-808.

Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90: 479-496.

Seónadh OL, Michael S, Torres S 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 8: 170-176.

Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 38: 2602-2610.

Waltman WD. Methods for the cultural isolation for Salmonella 2000. In: Wray & Wray. *Salmonella in Domestic Animals*. USA, New York, 355-372.



Fonte: Renata Cunha Madureira – Fiscal Federal – MAPA

FIGURA1: Fotografia de uma lesão sugestiva de brucelose bovina no ligamento cervical de animal abatido em frigorífico sob inspeção federal em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

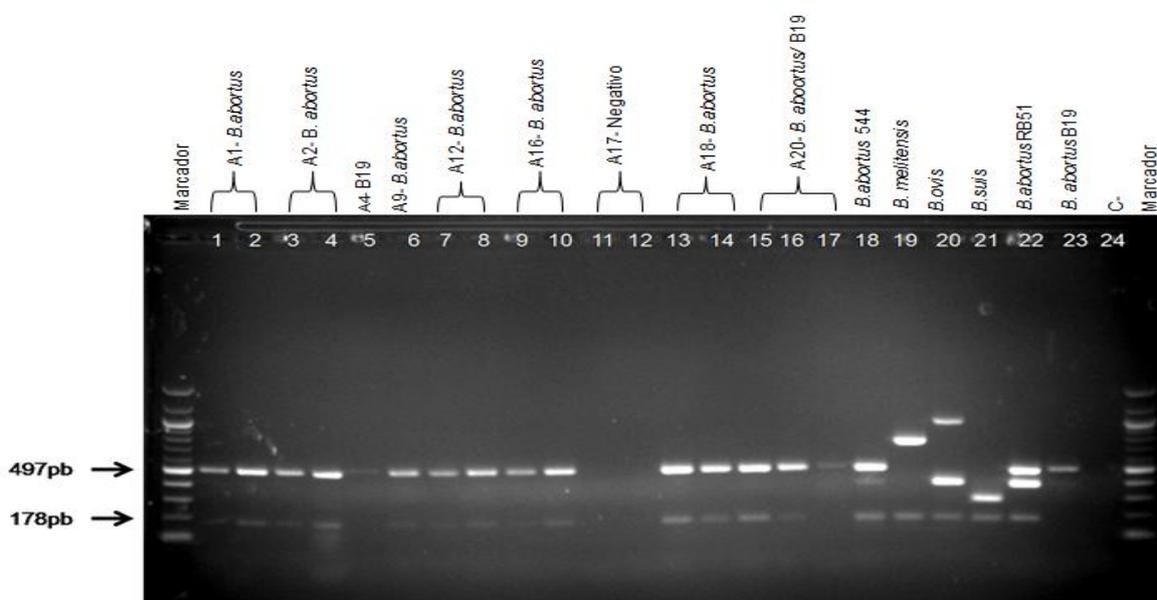


FIGURA 2: Amplificação da PCR-AMOS com DNA extraído de colônias cultivadas em meio TSA, positivas para *Brucella* spp, identificadas por PCR convencional utilizando os oligonucleotídios bcps31, de animais de frigoríficos com lesões sugestivas para brucelose. Canaletas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17 = apresentando amplificação de um produto de 498pb e uma de 178pb referente animais positivos para *B. abortus* biovar (1, 2 e 4); 5 e 17= amplificação de um produto de 498pb referente a cepa vacinal B19; 11 e 12= animais negativo;18= controle positivo *B. abortus* 544; 19=, controle positivo *B. melitensis* M16; 20= controle positivo *B. ovis* Reo 198; 21= controle positivo *B. suis*; 22= controle positivo *B. abortus* vacinal RB51; 23= controle positivo *B. abortus* controle vacinal B19 e 24= controle negativo.

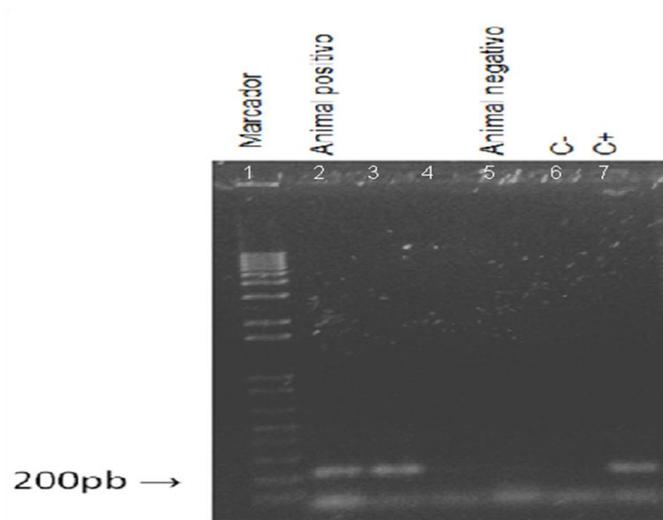


FIGURA 3: PCR convencional de DNA extraído de sangue de bovinos de frigorífico com lesões sugestivas para brucelose utilizando o oligonucleotídeos bcps31. Canaletas: 1= marcador molecular 1 Kb *Plus*; 2 e 3 = animais positivos; 4 e 5= animais negativos; 6=controle negativo e 7= controle positivo utilizando cepa a campo 2308.

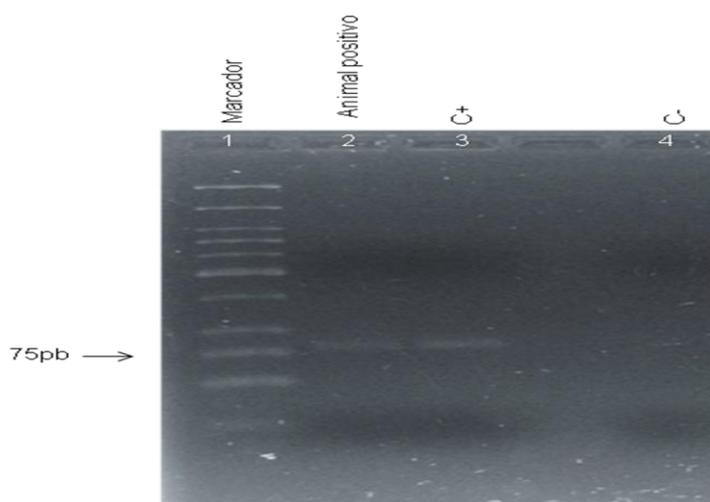


FIGURA 4: PCR convencional de DNA extraído de sangue de bovinos de frigorífico com lesões sugestivas para brucelose utilizando o oligonucleotídeos BruAb_0168. Canaletas: 1= marcador molecular *low molecular weight DNA ladder* (25pb-766pb); 2= animal positivo; 3= controle positivo utilizando cepa a campo 2308 e 4= controle negativo da PCR.

Curva de Dissociação

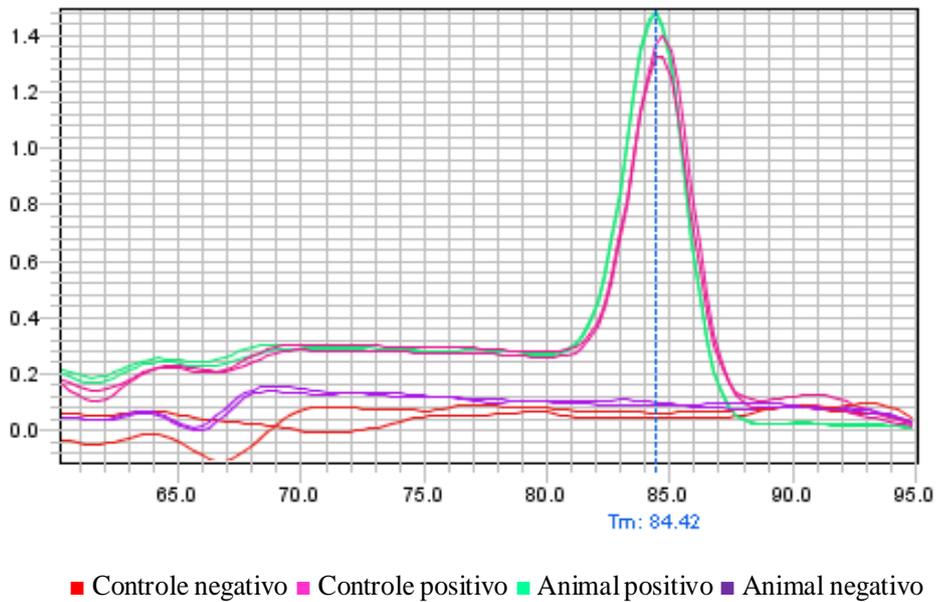


FIGURA 5: Padrão da curva de dissociação (Melt curve) específica para o oligonucleotídeo iniciadores BruAb_0168. Como controle negativo foi utilizando material livre de DNA; como controle positivo o DNA de *Brucella abortus* cepa selvagem 2308; amplificação de um produto referente a *B. abortus* utilizando o DNA de um animal abatido em frigorífico com lesão sugestiva e animal negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação (Tm).

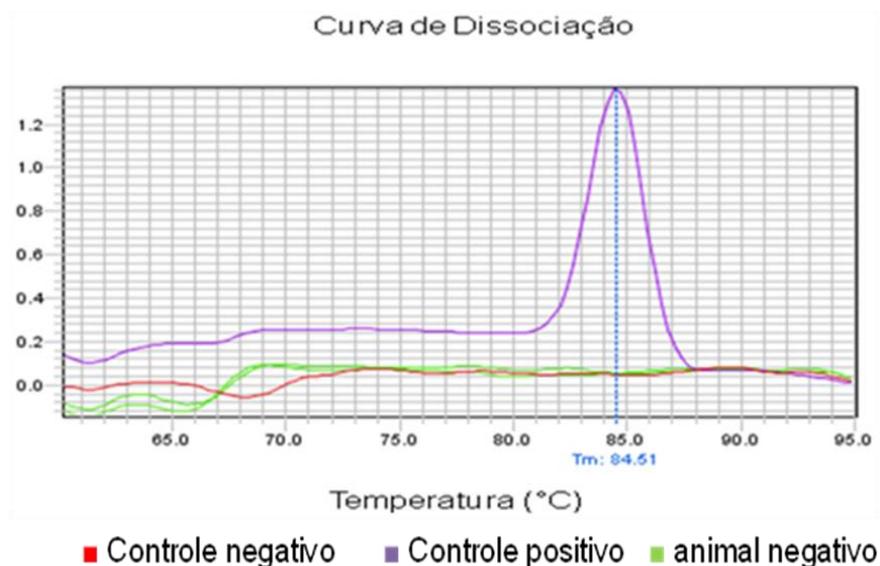


FIGURA 6: Padrão da curva de dissociação (Melt curve) específica para os oligonucleotídeos iniciadores BruAb_0168 com DNA de *Brucella abortus* cepa padrão 2308 como controle positivo, animal certificado pelo MAPA como negativo para brucelose e controle negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação (Tm).

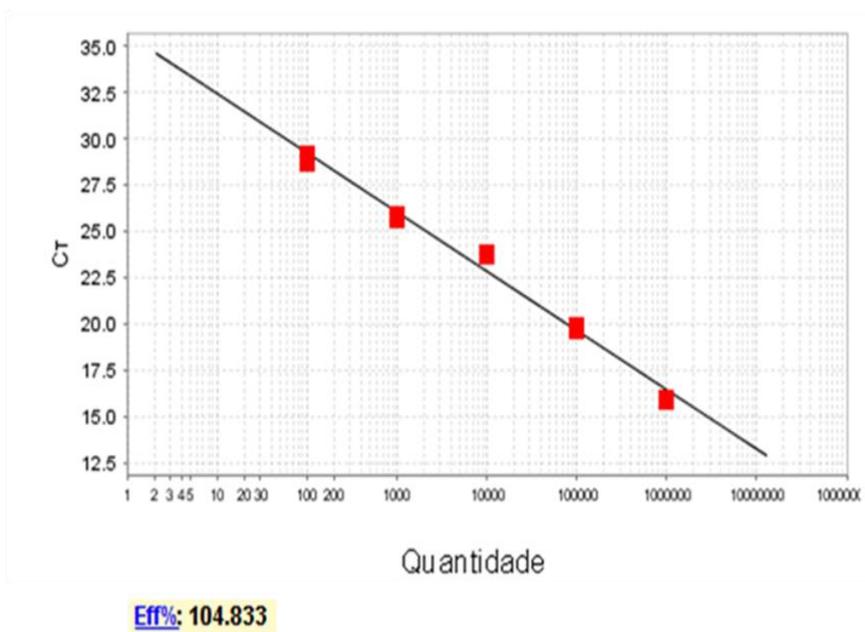


FIGURA 7: Curva padrão do teste de sensibilidade dos iniciadores BruAb_0168 com DNA da cepa padrão *Brucella abortus* 2308. O eixo Y (Cq - Ciclo de Threshold) corresponde ao ciclo limiar de amplificação, e o eixo X à concentração de DNA na amostra.

Curva de Dissociação

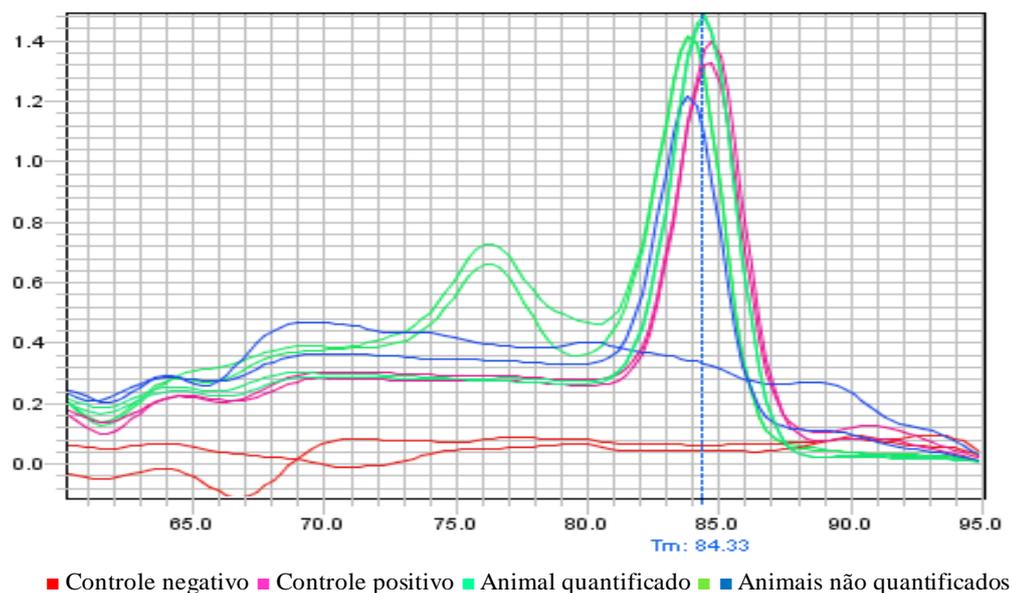


FIGURA 8: Padrão da curva de dissociação (Melt curve) específica para os oligonucleotídios iniciadores BruAb_0168 com DNA de *Brucella abortus* cepa padrão 2308 como controle positivo, animal quantificado, animais não quantificados e controle negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação.

TABELA I: Descrição dos oligonucleotídios iniciadores utilizados para a identificação de *Brucella* spp na PCR convencional e qPCR.

Oligonucleotídeo	Patógeno	Sequência 5'-3'	Pares de Bases	Referência
BHBa ^{a,d}	<i>B. abortus</i>	GACGAACGGAATTTTCCAATCCC	498	
BHBm ^{a,d}	<i>B. melitensis</i>	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	731	
BHBo ^{a,d}	<i>B. ovis</i>	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	976	Bricker; Halling 1994
BHBs ^{a,d}	<i>B. suis</i>	GCGCGGTTTCTGAAGGTTTCAGG	285	
BHIS711 ^{a,b,d}	<i>Brucella</i> spp.	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	-	
<i>ery</i> ^{a,d}	<i>B. abortus</i> <i>B19</i>	GCGCCGCGAAGAACTTATCAA CGCCATGTTAGCGGGGTGA	178	Bricker; Halling 1995
RB51/2308 ^{a,d}	RB51/2308	CCCCGCAAGATATGCTTCGATCC	364	
BruAb_0168 ^c	<i>B. abortus</i>	GCACACTCACCTTCCACAACAA CCCCGTTCTGCACCAGACT	81	Hinic et al. 2008
bcp31 ^d	<i>Brucella</i>	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG	223	Baily et al. 1992

^aOligonucleotídeos utilizados na PCR-AMOS; ^bOligonucleotídeo utilizado como reverso para os outros oligonucleotídeos na PCR-AMOS; ^cOligonucleotídeos utilizado na PCR convencional e qPCR; ^dOligonucleotídeo utilizado na PCR convencional.

TABELA III: Resultado das técnicas de isolamento, PCR convencional e qPCR utilizando os oligonucleotídios bcps31, Bru_Ab0168 e AMOS-PCR com amostras de DNA extraído de sangue, meio líquido TSB e meio sólido TSA dos animais de frigoríficos com lesão sugestiva para brucelose.

Amostra	Isolamento		PCR Convencional						PCR-TR
			TSA		TSB		Sangue		Sangue
	TSA	TSB	bcps31	AMOS	bcps31	BruAb_0168	bcps31	BruAb_0168	BruAb_0168
1	+	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	+	+	+
2	+	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	+	+	+
3	-	+	-	-	+	+	-	-	+
4	+	+	+	<i>S19</i>	+	+	-	+	+
5	-	+	-	-	+	+	+	+	+
6	-	+	-	-	+	+	-	+	+
7	-	+	-	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+
9	+	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+
10	+	+	-	-	+	+	-	+	+
11	+	+	-	-	+	+	-	+	+
12	+	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+
13	-	+	-	-	+	+	+	+	+
14	-	+	-	-	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	+	+	+
16	-	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+
17	+	+	+	-	+	+	-	-	+
18	-	+	-	-	+	+	-	+	-
19	+	+	+	<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+
20	+	+	+	<i>B.ab/S19</i>	+	+	-	+	+

TABELA IV: Tabela da quantificação dos animais positivos na qPCR para *Brucella abortus* utilizando os oligonucleotídeos BruAb_0168 por meio da curva de amplificação na qPCR com SYBR GREEN.

Amostras	Quantificação ^b	Erro
1	895.43	-
2	1, 386.216	-
3	8.851	-
4; 7; 11	-	Multiplos picos de (TD) ^a
5; 8; 12; 14;15;16;19	-	Alto desvio na replicação
6	19, 922.232	-
9	19, 682.480	-
10	3.338	-
13	329.836	-
17	7.433	-
18	-	-
20	442.843	-

^aTemperatura de Dissociação, ^bQuantificação referente ao número de cópias do DNA da bactéria/μL