

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM TECIDOS BOVINOS  
UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR e qPCR**

**Marrielen Aparecida Benites Caitano**

CAMPO GRANDE, MS  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO DE *Brucella abortus* em TECIDOS BOVINOS  
UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR e qPCR**

Detection of *Brucella abortus* in bovine tissue using PCR and qPCR

**Marrielen Aparecida Benites Caitano**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Grácia Maria Soares Rosinha**

**Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares**

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, MS

2013

Certificado de aprovação

**MARRIELEN APARECIDA BENITES CAITANO**

*Deteccão de Brucella abortus em tecidos  
bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR*

*Detection of Brucella abortus in bovine tissue  
using tests PCR and qPCR.*

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 12/07/2013

**BANCA EXAMINADORA:**



Doutora Grácia Maria Soares Rosinha  
(EMBRAPA) - (Orientadora)



Doutor André Luiz Julián Ferraz  
UEMS



Doutor Carlos Alberto do Nascimento Ramos  
EMBRAPA

*À minha mãe, que acredita no meu potencial e sempre me ajudou nas dificuldades, com todo o meu carinho... E ao meu esposo, que sempre me incentivou e me deu forças para que eu nunca desistisse... Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, luz que ilumina meu caminho, que me deu a oportunidade de vivenciar novas experiências, conhecer pessoas e aprender mais. Obrigada.

Agradeço à pessoa que me trouxe ao mundo, sem ela nada disso aconteceria em minha vida! Agradeço por toda ajuda, pela compreensão, pela paciência e pelo amor de mãe.

Ao meu esposo que sempre me apoiou e incentivou os meus estudos, pelo amor, carinho e paciência com relação às minhas atitudes.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Grácia, pela oportunidade de estágio e pela confiança que tem no meu trabalho.

Aos colegas de laboratório de Engenharia Genética Animal pelo apoio.

Às minhas amigas irmãs, Aline, Anna Letícia, Renata e Mônica, pelo ombro amigo, pelas fases boas e fases ruins da vida e do nosso cotidiano. Obrigada pela amizade sincera, doce e verdadeira. Vocês fazem parte desta minha conquista porque também vivenciaram cada meta alcançada.

Agradeço também à Goretti, que sempre está disposta a ajudar e a aprender junto com a gente, que não tem vergonha de dizer “eu não sei” e busca de todas as maneiras aprender para nos ajudar.

Aos técnicos Maxwell e José Gomes, que colaboram para que todos os equipamentos do laboratório estejam em perfeito funcionamento, socorrendo-nos quando há imprevistos.

Ao Dr. Carlos e a doutoranda Ana Beatriz que me auxiliaram na realização da PCR em Tempo Real.

Ao Dr. André Luiz pela ajuda nas análises da PCR em tempo real e por todas as dicas e sugestões que contribuem para que o trabalho fique cada vez melhor.

A Embrapa Gado de Corte por ceder o local para a realização do experimento, ao CNPq pelo financiamento do projeto e a Capes pela bolsa de estudos.

*“Se quisermos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova”*

*(Mahatma Gandhi)*

## Resumo

AUTOR, Marrielen Aparecida Benites Caitano. Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR. Ano. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

A brucelose bovina é uma zoonose mundial que causa sérios danos econômicos à produção pecuária. Esta associada, principalmente, a problemas reprodutivos que ocasionam a diminuição da produtividade. No abate de bovinos, lesões características da doença podem ser encontradas e, conseqüentemente estarem associadas à infecção causada por *Brucella abortus*. O diagnóstico da doença é feito por diferentes métodos, isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o diagnóstico clínico, baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos e dados epidemiológicos baseados na história dos rebanhos. A identificação da bactéria (diagnóstico direto) se faz por meio do cultivo microbiológico, utilizando tecidos e produtos dos animais infectados (tecidos fetais e placentários, sangue, útero, testículos, leite, queijo, secreções genitais) como pela pesquisa da resposta imunológica à infecção (diagnóstico indireto) que pode ser feito pela pesquisa de anticorpos, por meio de testes sorológicos. Para o diagnóstico de brucelose também são realizados testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que se baseia na amplificação de sequências específicas do DNA presente no genoma. A utilização da técnica de PCR atualmente é devido à mesma apresentar rapidez e sensibilidade, além da vantagem de detectar pequenas quantidades de microrganismos em diferentes substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, como ocorre na cultura bacteriológica. Outro ensaio chamado PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) tem sido utilizado para a detecção de antígenos associados a doenças infecciosas. Vários são os sistemas para detecção de sequências-alvo na qPCR, que tem como princípio baseado na detecção da fluorescência na reação à medida que o DNA dupla fita é gerado, na presença de um agente fluorescente que se incorpora entre a dupla fita, sem a necessidade de eletroforese posterior. Diante das exigências que surgem, novos testes de diagnóstico devem ser implantados, para que se tenham resultados precisos em curto espaço de tempo e que venham a ser incorporados em programas de vigilância sanitária bem como ser preconizado pelo MAPA.

Palavras Chaves: Brucelose, isolamento, sequenciamento, diagnóstico.

## Abstract

AUTOR, Marrielen Aparecida Benites Caitano. Detection of *Brucella abortus* in bovine tissue using PCR and qPCR. Ano. 2013 56 f. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The bovine brucellosis is a worldwide zoonosis that causes serious economic damage to livestock production. This affects mainly the reproductive problems that cause decreased productivity. Slaughter of cattle, lesions characteristic of the disease can be found and therefore are associated with infection caused by *Brucella abortus*. The diagnosis is made by different methods, alone or in combination. Among them is a clinical diagnosis, based on clinical signs of miscarriage, birth of weak calves and sterility of females and males and epidemiological data based on the history of the herds. The identification of bacteria (direct diagnosis) is done by means of microbiological culture, using tissues and products of infected animals (fetal and placental tissues, blood, uterus, testis, milk, cheese, genital secretions) as a search of the immune response to infection (diagnosis indirect) which can be done by antibodies by serological tests. For the diagnosis of brucellosis tests are also performed as the molecular chain reaction (PCR) which is based on amplification of specific DNA sequences present in the genome. The use of PCR is now present due to the same rapidity and sensitivity, in addition to the advantage of detecting small numbers of microorganisms in various substrates without the need to be feasible, as in bacterial culture. Another test called Real-time quantitative PCR (qPCR) has been used for the detection of antigens related to infectious diseases. There are various systems for detecting target sequences in qPCR, whose principle is based on the detection of fluorescence in the reaction as the double stranded DNA is generated in the presence of a fluorescent agent which is incorporated between the double stranded without need for subsequent electrophoresis. Given the requirements that arise, new diagnostic tests should be deployed so that they have accurate results in a short time and that may be incorporated into programs for health monitoring as well as being recommended by the MAPA.

Keywords: Brucellosis, isolation, sequencing, diagnosis.

## Lista de abreviaturas e siglas

TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
AAT	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado
2-ME	Teste do 2-Mercaptoetanol
TAL	Teste do Anel em leite
RFC	Reação de Fixação do Complemento
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
SAL	Soroaglutinação Lenta
IgM	Imunoglobulina M
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
MG	Minas Gerais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
et al	e colaboradores
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
FPA	Teste de Polarização de Fluorescência
μL	Microlitro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
pMol	Picomol
HCl	Ácido Clorídrico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
ng	Nanograma
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
° C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1 Classificação taxonômica e características do gênero</b> .....	12
<b>2.2 Breve histórico do agente</b> .....	13
<b>2.3 Patogenia</b> .....	15
<b>2.4 Epidemiologia</b> .....	16
<b>2.5 Sinais Clínicos</b> .....	17
<b>2.6 Diagnóstico</b> .....	18
2.6.1 Métodos indireto .....	18
2.6.2 Métodos diretos .....	20
2.6.3 Técnicas moleculares .....	21
<b>2.7 Diagnósticos Moleculares para detecção de patógenos</b> .....	23
<b>Referências</b> .....	27
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a pecuária é a atividade que ocupa a maior área dentre todas as atividades agropecuárias desenvolvidas no Brasil. São 171 milhões de hectares de pasto, com cerca de 212 milhões de cabeças de gado, tornando assim a bovinocultura um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial (ABIEC, 2013; IBGE).

Em 2011, o Brasil ocupava a 2ª posição mundial em rebanho de gado bovino, atrás da Índia, cujo rebanho era de 324,5 milhões, cerca de 1,5 vezes maior que o brasileiro, porém não é um rebanho comercial e inclui búfalos. Na sequência, destacaram-se China e os Estados Unidos (IBGE, 2011). O Brasil também é considerado o segundo maior produtor e consumidor mundial de carnes (atrás dos Estados Unidos), produzindo em média 9 milhões de toneladas anuais e um valor bruto associado de R\$ 54 bilhões em 2008 (SCHLESINGER et al., 2010). Para 2013 a previsão da produção do Brasil, segundo a USDA (2012), é de 9.210 milhões de toneladas de carne bovina o que equivale um aumento de 2,5% da demanda internacional como também um pequeno aumento da demanda interna.

Na busca de melhorar cada vez mais a participação na economia com avanços produtivos, incluindo nesse contexto a comercialização de carne bovina com qualidade para o consumidor, o Brasil precisa melhorar a qualidade sanitária de seus produtos. Sendo assim, a rastreabilidade e os programas voltados para sanidade animal, envolvendo controle e erradicação de doenças através de vacinações, tratamentos e profilaxia, são requisitos fundamentais para que o país possa manter-se como exportador e expandir a competitividade no mercado (SOLA, 2011).

A ocorrência de doenças que atingem o rebanho em um país ou em uma região pode resultar em perdas econômicas significativas como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional e produtos de origem animal (SOLA, 2011) e, além de por em risco a saúde do rebanho, podem representar um problema de saúde pública, como é o caso da brucelose (SOUZA, 2009).

A brucelose é uma zoonose presente no mundo todo, com exceção de alguns países desenvolvidos que conseguiram erradicá-la ou pelo menos reduzir as taxas de prevalência. Em países em desenvolvimento ainda trabalha-se para alcançar esta meta. É uma doença infecciosa crônica causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella* que acometem várias espécies de animais (GEERING et al., 1995).

As espécies deste gênero apresentam hospedeiro preferencial, o que confere à brucelose características próprias de disseminação, ou seja, tem potencial de existir em diferentes ambientes, podendo adaptar-se a diferentes hospedeiros. (WALKER 2003; NICOLETTI 1989;

BOSCHIROLI et al. 2001; HALLING et al. 2005). A bactéria *Brucella abortus* infecta, principalmente, bovinos de corte e leite provocando elevados prejuízos econômicos. (CORBELL, 1997; POLETTO et al., 2004).

Além de *Brucella abortus*, outras espécies de *Brucella* como *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar brucelose nos bovinos quando estes estão em contato com suínos, caprinos e ovinos, que são, respectivamente, os portadores naturais destes agentes (ACHA & SZYFRES, 2003, OIE, 2008). Vale ressaltar que *B. melitensis* ainda não foi isolada no Brasil (POESTER et al., 2002; BRASIL, 2006).

As perdas econômicas causadas por esta enfermidade vão desde a geração de barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal (queda no preço da carne, leite e derivados), perdas na indústria (condenação do leite e da carne), altos custos dos programas de controle e erradicação e ainda prejuízos causados com abortos e a baixa fertilidade dos animais (JARDIM & PIRES, 2006).

Nos seres humanos, a doença é adquirida com maior frequência por ingestão de produtos lácteos não pasteurizados e seus derivados contaminados. Nos animais pode ocorrer infecção por contato venéreo, penetrações através de lesões na pele, inalação ou por via transplacentária (QUINN et al., 2005).

Tendo em vista o reconhecimento da importância dessa zoonose, o governo brasileiro por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

As principais medidas do programa foram implantar a vacinação obrigatória contra brucelose em fêmeas de três a oito meses de idade com a amostra B19 e definir como oficiais os testes de diagnósticos: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o Teste do Anel em leite (TAL) como testes de triagem e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e a Fixação do Complemento (FC) como testes confirmatórios (BRASIL, 2006).

Porém, esses testes possuem problemas com relação a resultados falso-positivos. A interferência de outros microrganismos, o estado de saúde do animal e a capacidade de não distinguir amostras vacinais de amostras de campo, geram resultados errados. Como o diagnóstico positivo significa a remoção do animal da população, as características de sensibilidade e especificidade dos testes são muito importantes, pois resultados falso-positivos significam sacrificar animais sadios, e resultados falsos negativos significam deixar fontes de infecção em contato com animais sadios (PAULIN, 2006b).

Recentemente novas técnicas vêm sendo introduzidas e uma delas é a PCR, um método útil para o diagnóstico por apresentar rapidez, sensibilidade e especificidade. Além disso, utilizam-se amostras de microrganismos patogênicos inativados de forma segura (PLIKAYTIS et al. 1991; IBRAHIM et al. 1992). Outra técnica desenvolvida que possibilita a detecção de microrganismos associados a doenças infecciosas é a PCR em Tempo Real (qPCR) (PETERS et al., 2004), que tem se destacado por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade em relação a PCR.

Poucos estudos têm utilizado essas técnicas diretamente de amostras de tecido. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar as reações de PCR e qPCR, para detecção de *Brucella abortus* diretamente em amostras de tecidos bovinos com lesões sugestivas. Espera-se com a presente avaliação, gerar subsídios para que o diagnóstico confirmatório de *Brucella abortus* em lesões sugestivas, possa ser realizado em menor tempo e com mais precisão do que o atualmente proposto pelo MAPA/Brasil (isolamento microbiano).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Classificação taxonômica e características do gênero

Reino Monera

Filo Proteobacteria

Classe Alphaproteobacteria

Ordem Rhizobiales

Família Brucellaceae

Gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella*, são coco-bacilos imóveis, gram negativos, intracelulares facultativos, apresentam-se em forma de colônias ou isoladas e podem infectar humanos e animais (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984).

São bactérias muito resistentes a fatores ambientais, podendo permanecer por longo período quando se encontram em ambientes com a presença de sombra, umidade e temperaturas baixas, ou permanecem em materiais de parto ou abortos nas pastagens por períodos de seis meses ou mais (WRAY, 1975).

No leite e produtos lácteos a sobrevivência da bactéria depende da temperatura e pH, podem permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação e a viabilidade é mantida mesmo sob congelamento (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

As espécies do gênero são sensíveis ao calor e à acidez, se submetidas à ação de desinfetantes comuns como compostos fenólicos a 2,5%, permanganato de potássio (1:5000), soluções de formaldeídos a 2%, a eliminação de *Brucella* ocorre em no máximo 15 minutos. O álcool 70% elimina imediatamente as bactérias (LAGE et al., 2008; OIE, 2009).

O crescimento *in vitro* ocorre entre 20° C a 40° C sendo que a temperatura ótima é de 37° C, e o pH ótimo está entre 6,6 a 7,4. A maioria das amostras requer meios de cultivo seletivos e complexos, contendo aminoácidos, tiamina, nicotinamida e íons de magnésio. Algumas amostras podem ser induzidas ao crescimento em meio mínimo, contendo sais de amônio como única fonte de nitrogênio. As colônias de *Brucella* tornam-se visíveis em meio sólido por dois ou três dias, podendo apresentar-se sob a forma lisa ou rugosa, dependendo da amostra (ALTON et al., 1988).

As bactérias do gênero *Brucella* possuem uma membrana celular externa composta principalmente de lipopolissacarídeos (LPS), o qual é considerado um dos principais fatores de

virulência deste gênero (MARTIN; HANCOCK, 1990). Podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas e as rugosas. A morfologia das colônias lisas e rugosas das linhagens de *Brucella* é dependente do lipopolissacarídeo (LPS). Quando a molécula de LPS possui dois domínios, a porção antigênica cadeia O e a porção tóxica lipídeo A, ela é completa e esta presente nas colônias lisas, mas não nas colônias rugosas. Nestas a molécula é incompleta não apresentando o antígeno O (SMITH; FICHT, 1990).

Os membros do gênero *Brucella* são bactérias patogênicas para os seres humanos e animais. Podem ser facilmente distinguidas das outras bactérias em funções fenotípicas e características bioquímicas, preferências de hospedeiro, estudos filogenéticos e análises sorológicas (MORENO, 1998; VELASCO et al., 1998b). Todos os membros do gênero *brucella* são parasitas primários e não requerem fatores de predisposição do hospedeiro (VELASCO, et al., 2000). Embora faça parte com outros parasitas intracelulares do grupo  $\alpha$ -Proteobactéria, a ausência de bacteriófagos ou plasmídeos lisogênicos é uma das características mais distintivas do gênero (MORENO & MORIYÓN, 2006).

As espécies do gênero *Brucella* são classificadas em: *B. melitensis* (isoladas de caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. suis* (suínos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovelhas), *B. canis* (cães), *B. ceti* e *B. pinipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos (focas, golfinhos, leões marinhos e baleias), *B. microti* (procedentes de ratazanas selvagens) (SCHOLZ, et al 2008) e *B. inopinata*, isolada de um implante mamário (humano) (SCHOLZ, et al 2010). Espécies de *brucella* constituem uma íntima relação do grupo monofilético com reassociação DNA-DNA com valores próximos de 100% (VERGER et al., 1985).

No entanto, deve ser salientado que a preferência pelo hospedeiro descrito para as espécies de *Brucella* não é tão rigorosa quanto parece ser. Estes organismos podem infectar experimentalmente ou em condições naturais outros animais que não sejam seu hospedeiro primário (EWALT, 1997).

A brucelose apresenta alterações que são encontradas no trato reprodutor do animal. Essas alterações são lesões que incluem placentite e/ou abortamentos, que levam a problemas como a infertilidade associada a perdas econômicas, e a facilidade com que algumas espécies do gênero *Brucella* podem ser transmitidas (direta ou indiretamente) aos animais e ao homem mostra a importância do controle desta enfermidade (GOMES, 2013).

## 2.2 Breve histórico do agente

A história da brucelose tem associação com a medicina militar (PAULIN & FERREIRA NETO, 2008). A brucelose foi descrita no homem pela primeira vez por Marston, cirurgião do

exército britânico, em 1859, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no mar Mediterrâneo (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

Considera-se, no entanto, que a brucelose tenha sido oficialmente descrita em 1887, pelo médico militar David Bruce que isolou a bactéria e descreveu a presença do agente no baço de soldados ingleses, que morreram em consequência de uma doença que se propagava na base naval inglesa da Ilha de Malta, a qual foi denominada *Micrococcus melitensis*. Os soldados apresentavam doença crônica debilitante com complicações reumáticas devido à ingestão de leite cru de cabras. Em homenagem a Bruce, a espécie foi renomeada de *Brucella melitensis* (NICOLETTI, 2002; PAULIN, 2006; MANTUR et al., 2007).

Em 1895, o patologista veterinário dinamarquês Bernhard Bang isolou uma bactéria de fetos abortados de bovinos, denominada *Bacillus abortus* (NICOLETTI, 2002).

A necessidade de estudar a doença, assim como o seu meio de transmissão, levou à formação da Comissão da Febre Mediterrânea em 1904, com Bruce como dirigente. Faziam ainda parte desta comissão, o bacteriologista Themistocles Zammit e William Horrocks, que em pouco tempo também contribuíram significativamente para o conhecimento que temos hoje sobre esta patologia (TONNA, 2005; VASSALLO 1996).

O primeiro caso relatado de brucelose humana no Brasil foi no ano de 1913, por Gonçalves Carneiro, e no ano seguinte, Danton Seixas realizou o primeiro diagnóstico clínico da brucelose bovina no país no estado do Rio Grande do Sul (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; VIEIRA, 2004).

O primeiro estudo sobre brucelose bovina no Brasil foi feito por Tineciro Icabaci, por ocasião do I Congresso Nacional de Medicina Veterinária, em 1922, pesquisando tecidos oriundos de fetos abortados. Ele descreveu um foco de brucelose bovina em São Paulo no município de São Carlos. Em 1928 os pesquisadores Tiago Melo e Neiva, isolaram *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia abortado. Silvio Torres em 1931 verificou a existência de oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados (BRASIL/MAPA, 1997; BRASIL/MAPA, 2001).

Vários estudos sorológicos foram conduzidos no Brasil entre 1950 e 1974. Em 1975, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou o primeiro inquérito sorológico nacional (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Sendo considerada uma doença endêmica no país, tem sido diagnosticada em todos os estados da federação (ANSELMO E PAVEZ, 1977; POESTER et al., 2002).

Tendo em vista o reconhecimento da importância dessa zoonose, o governo brasileiro por meio do MAPA, criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da

Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional.

### 2.3 Patogenia

A patogenicidade das bactérias do gênero *Brucella* está intimamente relacionada com os mecanismos que permitem sua invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular nas células do hospedeiro, mantendo-as protegidas da ação do sistema imune (ARESTÉGUI et al., 2001; NIELSEN et al., 2004; XAVIER et al., 2009). A sobrevivência da bactéria nas células fagocíticas do hospedeiro, em parte, está relacionada à inibição da fusão do fago-lisossomo e do organismo em estimular um nível efetivo de degranulação após a entrada do agente (GOMES, 2011).

A infecção por *B. abortus* se dá pelo contato do agente com qualquer mucosa suscetível do animal, principalmente a mucosa oral (THOEN, et al 1993). As bactérias são levadas até os linfonodos regionais, principalmente por macrófagos, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses (BISHOP et al., 1994).

A partir dos linfonodos regionais, os microrganismos podem se disseminar livremente ou no interior de macrófagos, pela via hemática e linfática alojando-se em outros linfonodos, principalmente os supra mamários, e em órgãos como baço, fígado e outros tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver nestes locais por longos períodos, escapando da resposta imune (GORVEL & MORENO, 2002; CAMPAÑA et al., 2003; LAGE et al., 2008; LIRA, 2008; MATRONE, et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

O estado fisiológico do animal é que determina o curso da doença. Os animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção. Quando a fêmea não esta prenhe, a bactéria geralmente infecta os linfonodos e glândulas mamárias (NICOLETTI, 1980; CRAWFORD et al., 1990) e quando a fêmea encontra-se prenhe, a bactéria aloja-se principalmente no útero gravídico devido a alta concentração de eritritol (LAGE et al., 2008).

A permanência de *Brucella* no interior das células de defesa está relacionada com a síntese de enzimas antioxidantes e a produção de guanosina e adenina que inibem a fusão do fagossomo com o lisossomo impedindo a degranulação dos macrófagos durante a fagocitose, e a destruição do agente (ARESTÉGUI et al., 2001; BALDWIN & PARENT, 2002).

Em humanos, a brucelose é adquirida pelo contato com animais infectados e consumo de leite não pasteurizado e seus derivados contaminados (NICOLETTI, 1989). Causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, e em animais

domésticos os órgãos reprodutores são os mais afetados pela doença, causando aborto e infertilidade temporária (YOUNG, 1983).

## 2.4 Epidemiologia

A brucelose é uma antropozoonose conhecida desde épocas remotas. Há registros de que Hipócrates, em 460 A.C., fazia referência à pacientes com sintomas compatíveis com brucelose (CAPASSO, 2002).

Por causar prejuízo à pecuária e por ser transmitida dos animais para o homem, desde o início do século XX, muitos países têm adotado medidas severas de controle e erradicação da brucelose na população animal (POESTER et al., 2009). Os resultados alcançados pelos países, segundo os programas de controle, variam muito, pois há registros de sucessos e fracassos citados na literatura especializada (POESTER et al., 2009).

No Brasil, uma das grandes preocupações, tanto de saúde animal quanto de consequente risco para a saúde pública, é a brucelose bovina, causada pela espécie *B. abortus*, devido ao tamanho e a distribuição do rebanho brasileiro, e pelas taxas de prevalência da infecção (MATHIAS, 2008). A presença da doença no rebanho brasileiro, tanto de corte como de leite, ainda é muito alta, e causa grandes prejuízos aos sistemas de produção (CHATE et al., 2009).

Em 1975, um levantamento nacional estimou a prevalência para cada região do país. Neste estudo a região Norte obteve uma prevalência de 4,1%; a região Nordeste com 2,5%; a região Centro-Oeste com 6,8%; Sudeste com 7,5% e região Sul com 4% (BRASIL, 1977) este foi o último diagnóstico nacional realizado (POESTER et al., 2002).

Em Mato Grosso do Sul no ano de 1998, a prevalência estimada de brucelose foi de 6,3%, a mesma obtida em 1975, no então Estado do Mato Grosso (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). Em estudos feitos por MONTEIRO et al. (2006) mostraram que a prevalência real de brucelose no rebanho bovino do Estrato 1 (composto por 22 municípios do estado) de MS é de 37,3% que compreende 210 propriedades amostradas. O resultado é inferior à observada no Estado de Mato Grosso (MT) (INDEA 2004), que ao utilizar metodologia semelhante encontrou 42,2%.

No ano de 2009, foram feitos novos estudos de prevalência em vários Estados brasileiros, sendo que Mato Grosso do Sul apresentou o maior índice de fazendas que apresentaram pelo menos um animal reagente à prova sorológica, chegando a ser da ordem de 41,5% (CHATE et al., 2009).

Sabe-se que a brucelose encontra-se disseminada em diversas áreas estudadas e a situação encontra-se heterogênea em diversos estados brasileiros. Evidenciou-se também uma

tendência de aumento da prevalência da brucelose no sentido Centro-Oeste/Norte do país, principalmente nos estados produtores de carne (POESTER et al., 2009). Foi observado nos estudos de MONTEIRO et al. (2006) que no grupo dos animais positivos, há mais chances de ocorrência da infecção por *Brucella abortus* em decorrência do predomínio dos seguintes fatores de risco: sistema de exploração de corte, raça Zebu e aborto.

A predominância de animais positivos em rebanhos de corte e da raça Zebu pode ser justificada pelo tipo de exploração (recria e engorda), que pressupõe ingresso, muitas vezes, indiscriminado de animais (POESTER et al., 2002).

Segundo a distribuição regional do efetivo de bovinos em 2010 34,6% dos bovinos encontravam-se no Centro-Oeste, 20,1% no Norte, e 18,3% no Sudeste do país. Os maiores efetivos de bovinos do Brasil encontravam-se no estado de Mato Grosso seguido pelos estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2010).

A forma mais eficiente e econômica para o Estado diminuir a prevalência de brucelose é por meio da vacinação, anual, de no mínimo 80% de bezerras entre três a oito meses com a amostra B19 (CHATE et al., 2009).

## 2.5 Sinais Clínicos

Os principais sinais clínicos observados nos animais infectados estão ligados a problemas reprodutivos (SILVA *et al.*, 2005). Como o principal sinal da enfermidade é o abortamento no terço final da gestação (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003), outros sinais como febre, secreção vaginal, inflamações, lesões articulares e bursites, sendo pouco frequentes, mesmo em rebanhos com altas prevalências da doença, têm valor reduzido na identificação de animais infectados nos matadouros. Nos machos, a infecção por *B. abortus* pode causar orquite com conseqüente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (CAMPERO, 1993).

Em infecções crônicas podem ser observadas lesões articulares como bursite e artrite, assim como lesões na glândula mamária. Placentite necrótica é a principal lesão encontrada nos animais que abortam. No feto abortado é observada com frequência pleurite fibrinosa, que pode estar associada à broncopneumonia supurativa e pericardite fibrinosa (NICOLETTI, 1990; XAVIER et al., 2009).

A confirmação da doença é feita por exame direto, e por exames indiretos ou sorológicos (NIELSEN & EWALT, 2004; POESTER et al., 2005)

## 2.6 Diagnóstico

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos, isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o diagnóstico clínico, baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos; dados epidemiológicos baseados na história dos rebanhos (POESTER et al., 2005; BOVINE, 2008).

O diagnóstico de brucelose pode ser feito tanto pela identificação da bactéria (diagnóstico direto) que se faz por meio do cultivo da bactéria, utilizando os tecidos e produtos dos animais infectados (tecidos fetais e placentários, sangue, útero, testículos, leite, queijo, secreções genitais) como pela pesquisa da resposta imunológica à infecção (diagnóstico indireto) que pode ser feito pela pesquisa de anticorpos, por meio de testes sorológicos (BEVILACQUA, 2008).

### 2.6.1 Métodos indiretos

Os testes sorológicos empregados para o diagnóstico da brucelose identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados, baseando-se em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (RAJASHEKARA et al, 2005; MINHARRO, 2009). No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os testes de:

Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) que consiste em uma soroaglutinação em placa, em que o antígeno em concentração de 8% de volume celular, é tamponado em pH baixo (3,65) e corado com rosa de Bengala. Essa acidificação do antígeno reduz a atividade da imunoglobulina de classe M (IgM), tornando a prova seletiva para a identificação da imunoglobulina de classe G (IgG) (ALTON et al., 1988). Entretanto o teste possui grande sensibilidade em animais imunizados com a vacina B19, podendo ocorrer reações falso-positivas (FOGASTE et al., 2002).

O Teste Anel em Leite (TAL) que é um método barato e eficaz para vigilância em bovinos de leite, revela imunoglobulinas da classe A (IgA) presentes no leite e aderidas as moléculas de gordura. São utilizados antígenos corados com hematoxilina que no teste com leite de bovino, se houver a presença de anticorpos, os mesmo reagirão com o antígeno, formando uma coloração azulada característica de reação positiva, ocorrendo pela interação do antígeno-anticorpo que arrastada pelos glóbulos de gordura gera a formação de um anel azulado na camada de creme do leite (PAULIN & FERREIRA NETO, 2002). Esta prova possui limitações, pois, na presença de leite ácido ou provenientes de animais com mamites, ou de animais em início de lactação (colostro) podem apresentar falso positivo (BRASIL, 2006).

Para a confirmação dos resultados positivos, é efetuada a combinação do Teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) com o Teste do 2-mercaptoetanol.

A Soroaglutinação Lenta em Tubos também é chamada de prova lenta – porque a leitura dos resultados é feita em 48 horas, esta prova permite identificar uma alta proporção de animais infectados, porém, costuma apresentar resultados falso-negativos, no caso de infecção crônica e, em algumas situações, podem aparecer títulos significativos em animais não infectados por *B. abortus* como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias. Em animais vacinados com B19 acima de 8 meses, uma proporção importante deles podem apresentar títulos de anticorpos para essa prova por um longo tempo, ou permanentemente. É uma prova padronizada frente a um soro padrão internacional, sendo o resultado expresso em unidades internacionais (BRASIL, 2006).

O Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) tem sua especificidade aumentada por um processo químico, que consiste no tratamento do soro com o mercaptoetanol que degrada a IgM em cinco unidades monoméricas, por redução de pontes dissulfídicas que estabilizam o polímero, assim este procedimento impede a ocorrência da maioria das reações inespecíficas (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). E para se confirmar resultados duvidosos no teste do 2-mercaptoetanol foi preconizada a Reação de Fixação de Complemento (RFC) que consiste na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento e com isso detectar IgG1 no soro em torno do 14º dia. Esta técnica também é capaz de revelar casos progressivos, em que a IgM desapareceu e os níveis de IgG1 são baixos, devido ao seu baixo limiar de detecção (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

No entanto, estes testes podem ocorrer reações inespecíficas decorrentes do compartilhamento de epítomos com outros gêneros bacterianos ou até mesmo envolvendo imunoglobulinas da classe IgM, provenientes da vacinação contra a brucelose, gerando resultados falso-positivos (COSTA, 2001; MINHARRO, 2009).

Mais recentemente, novas provas sorológicas têm sido desenvolvidas. Testes imunoenzimáticos do tipo ELISA de competição e indireto que detectam anticorpos no soro, no sangue total e no leite têm demonstrado ser de grande valor diagnóstico, pois apresentam alta sensibilidade e especificidade (NIELSEN, 2002; POESTER et al., 2005; BOVINE, 2008). O Teste de Polarização de Fluorescência (FPA) que se fundamenta na comparação de velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação dos complexos anticorpo-antígeno-conjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno-conjugado isolado. Por meio da utilização de controles e de soro pré-titulado, é possível calcular a quantidade de anticorpos presente no soro testado. O teste é

concluído em poucos minutos; pode ser realizado em soro e leite e tem-se mostrado muito promissor para o diagnóstico de brucelose também em outras espécies (BRASIL, 2006).

### 2.6.2 Métodos diretos

Os métodos diretos para o diagnóstico de brucelose bovina incluem o isolamento do agente e a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes métodos são empregados geralmente quando já ocorreu a manifestação dos sinais clínicos e a bactéria já se encontra disseminada no rebanho, sendo importante a confirmação dos focos e a caracterização do agente (MATRONE, 2009, VERAJANO RUBIAL, 2009).

O método de isolamento considerado padrão ouro possui alta especificidade e capacidade de diferenciação entre as espécies. No entanto, a identificação da *Brucella* spp. é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de materiais contaminados e também exige meios de cultivos sensíveis para o isolamento da bactéria, sem a interferência de outros microrganismos (LAGE et al., 2008; CORBEL et al., 2006), e exige também a observação de normas estritas de biossegurança (CHOSEWOOD & WILSON, 2007).

O isolamento apresenta bons resultados se a coleta e o transporte das amostras forem bem realizados e se o processamento for realizado em laboratórios capacitados com experiência. Entretanto poucos são os laboratórios que realizam o exame, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento. (WHO, 2009.)

Para o isolamento necessita-se de material proveniente de tecidos oriundos de aborto ou de secreções como leite, sêmen e líquido sinovial de articulações comprometidas (LAGE et al., 2008; VERAJANO RUBIAL, 2009) em casos de aborto, os materiais de preferência são: os anexos placentários e o conteúdo gástrico, além do baço, fígado, pulmão e rim dos fetos (BOVINE, 2008).

Segundo PAULIN & FERREIRA NETO (2003) devem ser colhidos no momento do abate das carcaças dos bovinos, os linfonodos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos, mas principalmente os supra mamários onde se consegue um ótimo isolamento do agente dos animais infectados (CAMPAÑA et al., 2003; LIRA, 2008).

No isolamento inicial, as colônias são observadas de 3 a 5 dias de incubação, em alguns casos é necessário a incubação por até 21 dias. Em alguns biovars de *B. abortus* são necessárias elevadas concentrações de CO<sub>2</sub>, e algumas espécies exigem meios enriquecidos com 5% de soro fetal bovino (WALKER, 2003). As colônias de *Brucella* spp. possuem coloração azulada características quando examinadas sob luz transmitida obliquamente, são consideradas

Gram negativas e coram-se bem pelos métodos de Ziehl-Neelsen e Koster modificados (CHU & WEYANT, 2003).

A identificação de *Brucella spp.* pode ser feita por meio de características fenotípicas e por provas bioquímicas que identificam diferenças metabólicas entre as espécies e biótipos. Entre as principais provas estão: necessidade de CO<sub>2</sub>, presença de H<sub>2</sub>S, tionina, fucsina básica, aglutinação em soro, tempo de atividade da uréase (ALTON et al., 1975; CLOECKAERT & VIZCAINO, 2004).

Outra técnica que também constitui um método de diagnóstico direto é a imunohistoquímica, que se destaca pela alta praticidade e ausência da viabilidade do agente nos tecidos. Tem sido utilizada como técnica auxiliar nos estudos de patogenia e diagnósticos de enfermidades como a brucelose. É realizada a partir de materiais de aborto fixados em formol, assim permite a identificação do agente com a especificidade das reações antígeno-anticorpo e a visualização de características das lesões examinadas (MINHARRO, 2009; XAVIER et al., 2009).

### 2.6.3 Técnicas Moleculares

Para o diagnóstico de brucelose também são realizados testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase que se baseia na amplificação de sequências específicas do DNA presentes no genoma.

Como o gênero *Brucella* possui o genoma amplamente conservado entre as espécies, a maioria das reações de PCR desenvolvidas é gênero-específicas, ou seja, amplificam sequências de DNA comuns às diferentes espécies de *Brucella* (HALLING et al., 2005), mas com a evolução da ciência já existem variações da mesma técnica, como AMOS-PCR capaz de diferenciar *B. abortus* biovars 1, 2 e 4; *B. melitensis*; *B. ovis* e *B. suis* biovar 1. O princípio da técnica baseia-se no fato de que, apesar do número de cópias e a localização do elemento de inserção IS771 ser tipicamente conservado nas espécies de *Brucella*, a maioria das espécies possui pelo menos uma cópia deste elemento em localização única em seu cromossomo (BRICKER & HALLING, 1994).

Esta técnica é uma ferramenta importante de diagnóstico e fornece dados de estudos epidemiológicos da doença mais detalhados, pois fornece informações relacionadas à espécie e biovar das amostras de *Brucella sp.* isoladas, além de diferenciar amostras vacinais. Também pode ser aplicada em programas de controle e vigilância da brucelose (LE FLÈCHE et al., 2006).

Atualmente a técnica de PCR tem sido utilizada devido à mesma apresentar rapidez e sensibilidade, além da vantagem de detectar pequenas quantidades de microrganismos em diferentes substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, como ocorre na cultura bacteriológica (ANGREVES, 2008; SILVA JUNIOR, 2008).

Outro ensaio de PCR chamado PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) tem sido utilizado para a detecção de antígenos associados a doenças infecciosas. O seu desenvolvimento resultou de uma complementação da técnica criada por MULLIS (1986). A primeira qPCR foi realizada por simples adição de brometo de etídio na mistura para PCR e acompanhamento da amplificação através das propriedades fluorescentes (HIGUCHI et al., 1993). Para aumentar a sensibilidade, brometo de etídio foi posteriormente substituído pelo corante SYBR Green (SCHNEEBERGER et al., 1995). A descoberta de fluoróforos associada à tecnologia óptica e da informática, possibilitou o monitoramento da reação em cada ciclo, revolucionando os processos de quantificação de fragmentos de DNA e RNA (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

A técnica foi implementada com o desenvolvimento de um equipamento que, num único compartimento, apresenta termociclador, sistema ótico e câmera CCD (Charged Coupled Device).

Na PCR em Tempo Real, vários são os sistemas para detecção de sequências-alvo, sistemas de Fluorescência intercalante (SYBR Green, EVA Green, SYTO 9), tecnologias baseadas em detecção fluorogênica (primer LUX, AmpliFluor, Plexor) e sistemas de sondas FRET (sondas TaqMan ou sondas de hidrólise, molecular beacons, Scorpions, sondas de hibridização FRET), entre outros (GEQUELIN, 2011).

O sistema intercalante utiliza um corante que se liga a todo DNA dupla-fita presente na amostra. No decorrer da PCR, a amplificação da sequência-alvo gerará *amplicons* e o corante se ligará a essas cópias de DNA, resultando no aumento da intensidade de fluorescência. Esse sistema é útil para verificar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita e não necessita de uma sonda, o que reduz a configuração do ensaio e os custos (GEQUELIN, 2011). Porém como desvantagem, pode ocorrer à detecção de *primer dimers* ou *amplicons* não específicos (BUH GASPARIC et al., 2010).

Na metodologia por detecção fluorogênica um dos *primers* (em uma estrutura em forma de hairpin) contem um fluoróforo na extremidade 3'. À medida que é estendido, o fluoróforo produz sinal mais intenso e esse aumento de fluorescência esta diretamente ligada à formação do produto de PCR (BUH GASPARIC et al., 2010).

A utilização do sistema *fret* baseia-se na detecção de um sinal fluorescente emitido por uma molécula anelada a sequência de ácidos nucleicos (sonda). As sondas TaqMan® (sondas de hidrólise) são oligonucleotídeos desenhados para hibridizar em uma região interna do produto da PCR. Se a sequência-alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos oligonucleotídeos e é clivada pela atividade exonucleásica 5'-3' da Taq DNA polimerase enquanto o oligonucleotídeo é estendido. A clivagem separa o repórter do quencher, removendo a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão continue. As sondas clivadas a cada ciclo resultam no acúmulo de repórter livre e refletem a quantidade de produto formado (KUBISTA et al., 2006). A fluorescência é captada na fase de extensão e esse sistema tem como grande vantagem a alta especificidade (THELWELL et al., 2000).

A sonda deve ser desenhada de modo a localizar-se de uma a cinco bases do *primer Forward*. Sua temperatura de anelamento deve ser 10°C maior que a dos oligonucleotídeos iniciadores. Isso garante que, quando a enzima começar a estender, a sonda já estará anelada.

As sondas usadas em experimentos são conhecidas comercialmente como sondas TaqMan MGB. Possuem um quencher não fluorescente na extremidade 3' e uma molécula minor groove binder (MGB), que aumenta em 10°C a temperatura de melting da sonda. (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol, 2010). A reação com a TaqMan® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas (HOLLAND et al., 1991).

Considerando a precisão e a rapidez que a qPCR apresenta quando comparada ao cultivo microbiológico, esta técnica tem se mostrado eficiente no diagnóstico direto de microrganismos, atuando como ferramenta epidemiológica na detecção de *Brucella* spp.

## **2.7 Diagnósticos moleculares para detecção de patógenos**

Avanços no campo da biologia molecular têm gerado novas técnicas para o diagnóstico de infecções por meio da detecção de sequências nucleotídicas específicas dos microrganismos (MACENTE, 2009). É um setor emergente na medicina laboratorial. Atualmente, as principais áreas de interesse são a detecção de doenças genéticas, detecção, identificação e quantificação de microrganismos, genotipagem e estudos de vínculo genético (DEBNATH et al., 2010).

As técnicas moleculares atualmente utilizadas em rotinas de diagnóstico de doenças animais foram inicialmente desenvolvidas em pesquisas de genética molecular, virologia, microbiologia, imunologia, biologia celular, doenças genéticas, entre outras áreas (BRENTANO, 2011). Os avanços tecnológicos nos últimos anos, na qualidade e oferta de insumos e equipamentos desenvolvidos em laboratórios de pesquisa e empresas de

biotecnologia permitiram que algumas técnicas moleculares, tais como PCR, PCR quantitativa em tempo real e sequenciamento genômico, fossem adotadas como metodologias de diagnóstico confiáveis, rápidas, muito sensíveis e com melhor reprodutibilidade de resultados, viabilizando seu uso em diagnóstico (BRENTANO, 2011).

Na área de doenças infecciosas, a detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, se torna possível através das técnicas de biologia molecular. As técnicas moleculares também podem ser empregadas na determinação de resistência antimicrobiana, no monitoramento de doenças através da quantificação da infecção e em estudos epidemiológicos (LINSCOTT, 2002).

Em vários diagnósticos laboratoriais, tanto em testes confirmatórios bem como, para o acompanhamento do tratamento como, por exemplo, para doença de Chagas, os estudos de biologia molecular estão sendo empregados (GILBER, 2007).

A técnica que acarretou uma avalanche de inovações na área de biologia molecular foi a PCR, desenvolvida na década de 1980. A sua introdução resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia da PCR também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (MOLINA & TOBO, 2004).

Entre as principais técnicas resultantes de modificações da PCR, podemos citar o RT-PCR que utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa para converter uma amostra de RNA em cDNA antes da etapa de amplificação por PCR, permitindo estudo de vírus de RNA e análises de expressão gênica, *nested* PCR que emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de *primers* internos e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método, a *multiplex* PCR é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra. A PCR a partir de *primers* randômicos utiliza sequências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico e é bastante empregado em estudos epidemiológicos e a PCR quantitativa em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente, num sistema fechado, sendo necessário para isto um termociclador que possua sistema de monitoramento de emissão de fluorescência. Esta técnica é empregada para quantificação de amostras, como para testes de carga viral e monitoramento de doença residual mínima (MOLINA & TOBO, 2004).

Os exames que envolvem técnicas de biologia molecular são divididos em três etapas: extração, amplificação e análise (COLEMAN & TSONGALIS, 2006). A extração de

DNA/RNA é realizada, na grande maioria das vezes, por técnica que utilizam sílica convencional ou sílica magnética de forma manual ou automatizada (BRUNS et al., 2007). Após a extração, os ácidos nucleicos extraídos são pesquisados pela sequência alvo que se deseja detectar. A sequência amplificada é então analisada por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida, ou nestes mesmos géis após digestão com enzimas de restrição (pesquisa de mutações conhecidas), ou por eletroforese capilar (análise de fragmentos para paternidade), ou sequenciada (pesquisa de mutações desconhecidas), ou hibridizada contra um microarranjo (genotipagem do HPV), dentre outras (BARRA et al., 2011).

Mais de 80% dos testes moleculares realizados atualmente de doenças infecciosas é de detecção. A lista de doenças infecciosas inclui vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) vírus papiloma humano (HPV), o citomegalovírus (CMV), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, e *Mycobacterium tuberculosis*. Outros testes moleculares são aplicados na medicina forense, testes de paternidade, tipagem de tecido, oncologia, testes de alimentos e bebidas. Os testes de diagnósticos moleculares podem ser realizados com número muito pequeno de quantidade de tecidos obtidos a partir de pequenas biópsias e aspirados (DEBNATH et al., 2010).

Para o diagnóstico molecular de *Brucella* spp. já existem numerosos ensaios utilizando PCR que detectam e identificam as espécies, e vem crescendo cada vez mais os estudos nas análises para uma maior precisão e rapidez dos resultados. Várias estratégias têm sido exploradas na diferenciação de espécies de *Brucella*, incluindo “*locus specific multiplexing*” como o baseado no *IS711* (sequência de inserção); PCR-RFLP no locus *omp2* (GOMES, 2013).

Outra técnica que vem crescendo na área de diagnósticos é a espectrometria de massas MALDI-TOF. A técnica requer a disponibilidade de um espectrômetro de massas com fonte MALDI e modo de análise linear, que possibilita a obtenção de perfis de massas característicos do microrganismo isolado, e têm nas proteínas ribossomais os principais componentes dos espectros obtidos (ZARROUK et al., 1997).

Esta técnica tem sido apontada como uma metodologia molecular confiável, robusta, rápida, de larga-escala e fácil execução para a identificação de microrganismos bacterianos. A estimativa de tempo gasto e custo por isolado bacteriano testado é de, respectivamente, 8 minutos e 1,4 euros, ou seja, valores comparáveis aos de coloração de Gram, utilizada para a identificação de *Brucella* spp. (SENG et al., 2009).

Dentre as novas tecnologias desenvolvidas como um dos desdobramentos do sequenciamento dos genomas destaca-se a técnica de *microarrays*, ou *chips* de DNA. Esta técnica permite a investigação de milhares de genes de maneira simultânea e promete

revolucionar a medicina preditiva, diagnóstica e farmacológica por meio do aumento substancial da capacidade analítica dos processos moleculares (MOCELLIN & ROSSI, 2007).

A tecnologia de *microarrays* pode ser utilizada para a determinação de perfis de expressão gênica, ou para o estudo de genômica funcional. O princípio da técnica baseia-se principalmente na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos e no fato das sondas no *array* apresentarem sequências similares às dos genes de interesse, e complementares às do RNAm ou às do DNAc (DNA complementar), dependendo da tecnologia utilizada (DALMA-WEISZHAUSZ, et al.,2006; CHEUNG et al, 1999) .

O número de estudos envolvendo a utilização de *microarrays* para a identificação de novos genes e mecanismos moleculares têm crescido exponencialmente. Entretanto, apesar de robusta e conceitualmente simples, a utilização da tecnologia é ainda bastante limitada devido, principalmente, aos altos custos relativos à aquisição de equipamentos, chips e reagentes. Acredita-se que, à medida que os custos de reagentes e chips se tornem mais acessíveis, esse novo equipamento poderá ser gradualmente inserido na pesquisa básica e clínica como uma valiosa ferramenta para novas descobertas científicas em diversas áreas do conhecimento (GUINDALINI & TUFIK, 2007).

A partir do exposto, é possível concluir que o diagnóstico molecular é um setor do laboratório clínico em crescimento e continuamente novas abordagens e ferramentas dependentes da análise de ácidos nucleicos vêm sendo desenvolvidas. A utilização de técnicas com alta sensibilidade e especificidade aliada a tecnologias robustas, pode vir a auxiliar no diagnóstico rápido e preciso de doenças, podendo extinguir métodos laboriosos e que muitas vezes apresenta risco para os manipuladores.

## REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Estatísticas - Balanço da pecuária. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>> Acesso em: 10 abr. 2013.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Pan American Health Organization, Washington, 2003.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; PIETZ, D. E. **Laboratory techniques in brucellosis**. World Health Organization. 2. ed. Geneva, p. 175. 1975.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. Techniques For The Brucellosis Laboratory. **Institute National de la Recherche Agronomique**. Paris, p.13-61. 1988.
- ANGREVES, G. M. **Avaliação etiológica de bursite cervical e correlação com a brucelose em bovinos abatidos no estado de Mato Grosso**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
- ANSELMO, F. P.; PAVEZ, M. M. Diagnóstico de saúde animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 735p. 1977.
- ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI C. S.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, G. O. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinária México**, México, v. 32, n. 2. 2001. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2001/vm012f.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- BALDWIN, C. L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90. n. 1-4 , p. 367-82, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414157>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

BARRA, G. B.; CAIXETA, M. C.; COSTA, P. G.; SOUSA, C. F.; VELASCO, L. F. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 3, p. 254-260, 2011.

BEVILACQUA, M. R. **Brucelose em bovinos**. 2008. 28f. (Monografia). Instituto Qualittas em Pós- Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Castelo Branco (UCB).

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER , J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed) **Infectious Diseases of Livestock**. Austin: Texas A&M University Press. v. 2, p. 1053-1066. 1994.

BOSCHIROLI, M. L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Current Microbiology**. v. 4, p. 58-64, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília, DF, 1977. 525-602 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: Legislação**. Brasília: 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: Legislação**. Brasília: 2006. 36-42 p.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 33 de 24 de agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 6-7, p. 28 de novembro de 2008.

BRENTANO, L. Avanços em técnicas moleculares de diagnóstico. XXII Latin American Poultry Congress 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA->

avicultura/saude/artigos/avancos-tecnicas-moleculares-diagnostico-t608/165-p0.htm. Acesso em 19 Jun. 2013.

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.

BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**. v. 90, p. 433-434, 2002.

BRUNS D. E.; ASHWOOD E. R.; BURTIS C. A. Fundamentals of molecular diagnostics. St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier; 2007.

BUH GASPARIC, M.; TENGS, T.; LA PAZ, J. L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ŽEL, JANA.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 396, n. 6, p. 2023-9, 2010.

CAMPAÑA, R. N.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUCA, M. M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 2003. 20 p. Disponível em: <<http://www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=33079>> Acesso em: 13 abr. 2013.

CAMPERO C. M. Brucelosis en toros: una revisión. **Revista Medicina Veterinária**, v. 74, p. 8-14, 1993.

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

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKUL, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 46-55, 2009.

CHEUNG, V. G.; MORLEY, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. Making and reading microarrays. **Nature Genetics**. v. 21, 1999.

CHOSEWOOD L. C, WILSON D. E. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. Washington: US Government Printing Office. 409 p. 2007.

CHU, M. C.; WEYANT, R. S. *Francisella* and *Brucella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003, p. 789-804.

CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N. DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. In: LÓPEZ –GONI, I.; MORÓN, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. 1.ed. England: Horizon Bioscience, 2004. P. 1-23.

COLEMAN W. B.; TSONGALIS G. J. **Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian**. 2nd ed. Humana Press: Totowa, N. J.; 2006.

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 Wilkins. v. 1, p. 377-388, 1984.

CORBELL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

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

COSTA, M. Brucelose bovina e equina. In: CORREA, F. R.; SCHAILD, A. L. MENDEZ, M. D. C. **Doença de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela. 2.ed. v. 1, p. 187-197. 2001.

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, 1990. p. 131-151.

DALMA-WEISZHAUSZ, D. D.; WARRINGTON, J.; TANIMOTO, E. Y.; MIYADA, C. G. The affymetrix GeneChip platform: an overview. **Methods Enzymology**. p. 3-28. 2006.

DEBNATH, M.; PRASAD G. B. K. S.; BISEN P. S. Molecular diagnostics: promises and possibilities. **Dordrecht: Springer**, 2010.

EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; GEER, P. L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 9, n. 4, p. 417-420, 1997.

FOSGATE, G. T.; ADESIYUN, A. A.; HIRD, D. W.; JOHNSON, W. O.; HIETALA, S. K.; SCHURIG, G. G.; RYAN, J. Comparison of serologic test for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**. v. 63, n. 11, p. 1598 – 1605, 2002.

GILBER, S. R. Reação em Cadeia da Polimerase em Comparação com o Teste de Imunofluorescência Indireta (ifi) e Elisa (enzimaimunoensaio) no Diagnóstico para a Doença de Chagas. Disponível em: <[http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/18304/Dissertacao%20Formatadas oraia%20pdf.pdf;jsessionid=D00FE7C0B96124659D9052B00680EE0A?sequence=1](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/18304/Dissertacao%20Formatadas%20oraia%20pdf.pdf;jsessionid=D00FE7C0B96124659D9052B00680EE0A?sequence=1)> Acessado em: 27 de mai de 2013.

GEERING, W. A.; FORMAN J. A.; NUNN M. J. Exotic Diseases of Animals. Aust. Gov. Publishing Service, Canberra, Australia, p. 301-306, 1995.

GEQUELIN, L. C. F. **Padronização da técnica para quantificação do vírus epsteinbarr por PCR em tempo real em amostras de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas no hospital de clínicas da UFPR**. 2011. Dissertação (Mestre Biologia celular e Molecular) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, UFPR. Curitiba, Paraná.

GOMES, M. J. P. Gênero *Brucella* spp. **Microbiologia Clínica Veterinária**. Área de bacteriologia – UFRGS, 2011.

GOMES, M. J. P. Gênero *Brucella* spp. **Microbiologia Clínica Veterinária**. Área de bacteriologia – UFRGS, 2013.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracelular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 281-297, 2002.

GUINDALINI, C.; TUFIK, S. Uso de *microarrays* na busca de perfis de expressão gênica - aplicação no estudo de fenótipos complexos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 29, n.4, p. 370-374. 2007.

HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal Bacteriology**, v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; WATSON, G. D. R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** (NY) 11, n. 9, p. 1026-30, 1993.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R. & GELFLAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'- 3' exonuclease activity of *Thermos aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

IBGE. Produção da pecuária municipal 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2013.

IBGE. PPM 2011: Rebanho bovino cresce 1,6% e chega a 212, 8 milhões de cabeças. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2241>>. Acesso em: 19 abr. 2013.

IBRAHIM A. W.; LIESACK AND STACKEBRANDT, E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30. p. 1942-1947, 1992.

INDEA 2004. Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso, Cuiabá, MT. Disponível em: <<http://www.indea.mt.gov.br/html/index.php>> Acesso em: 17 jun. 2013.

JARDIM, G. C.; PIRES, P. P. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Mato Grosso do Sul, v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-127.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo horizote, [online], v. 32, p. 202-212, 2008. Disponível em: Disponível em <[www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)>. Acesso em: 14 Fev. 2011.

LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; A GUILLOTEAU, L.; VERGNAUD, G. Evolution and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 9, 2006.

LINSCOTT, A. J. Molecular diagnostics for infectious disease. **Pathology Case Reviews**. v. 7, n. 2, p. 64-69, 2002.

LIRA, N. S. C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intrapleural e conjuntival simultaneamente** [online], 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP – Campus Botucatu/ SP, Botucatu, São Paulo. Disponível em:

<[http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=113320](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=113320)>. Acesso em: 15 abr. 2013.

MACENTE, S. Diagnóstico Molecular De M. Tuberculosis: Uma Revisão De Técnicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 225 -231, mai./ago. 2009 - ISSN 1983-1870. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq>>. Acessado em 19 de junho de 2013.

MANTUR, B G.; AMARNATH, S. K.; SHINDE, R. S. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007.

MARTIN, N. L.; HANCOCK, R. E. W. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: ADAMS, G. (ED). **Advances in Brucellosis research**. Texas A and M-University Press. College Station, 1990. p. 55-75.

MATHIAS, L. A. Brucelose Animal e suas implicações em Saúde Pública. In: RAIB, 21, 2008, São Paulo. Palestra. São Paulo. **O Biológico**, p. 47 – 48, 2008.

MATRONE, M.; KEID, L. B.; ROCHA, V. C. M.; VEJARANO, M. P.; IKUTA, C. Y.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 480-489, 2009.

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 em: 10 Fev. 2013.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C. R. Principles of gene microarray data analysis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. p. 19-30, 2007.

MOLINA, A. L.; TOBO P. R. Série - Biologia Molecular Atualização Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Editora Associada da Einstien**. v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004. Disponível em: <<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>>. Acesso em: 25 Jun. 2013.

MONTEIRO, L. A. R. C et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006.

MORENO, E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: Why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? **FEMS Microbiology Reviews**. v. 22, p. 255–275, 1998.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1986.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances Veterinary Science Comparative Medicine**, v. 24, p. 69-98, 1980.

NICOLETTI, P. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG E. J.,; CORBEL M. J. (Eds). **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida. p. 41-51, 1989.

NICOLETTI, P. Bovine abortion caused by *Brucella* sp. In: Kirkbride, C.A. (Ed.). **Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**. 3. Ed. Ames: Iowa State University Press, p. 22-26. 1990.

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

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and

Escherichia coli O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 100, n. 1-2, p. 25-30, mai. 2004.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v.33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2012.

OIE/WHO. Bovine brucellosis. *In*: MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris, 6. ed. p. 624-659. 2008.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code. 2009.**

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 105-112, 2002.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO J. S. **O Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. Jaboticabal: Funep, 154 p. 2003.

PAULIN, L. M. S. Brucellosis en animales de América Del Sur. Estratégias de control. *In*: CACCHIONE, R.A.; DURLACH, R.; LARGHI, O. P.; MARTINO, P. (Ed.). **Temas de zoonosis III**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2006. Cap. 13. p. 130-140.

PAULIN, L. M. S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006b.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 389-401, 2008.

PETERS, R. P. H.; MOHAMMADI, T.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; DANNER, S. A.; VAN AGTMAEL, M. A.; SAVELKOUL, P. H. M. Detection of bacterial

DNA in blood samples from febrile patients: underestimated infection or emerging contamination. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, p. 249–253, 2004.

PLIKAYTIS, B. B.; EISENACH, K. D.; CRAWFORD, J. T.; SHINNICK, T. M. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5. p. 215-219, 1991.

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

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

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. 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*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 61, supl.1, p. 1-5, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61s1/a01v61s1.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2013.

POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G.. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, [online]. v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Edit. Artimed. 1ª Ed. 2005. p. 150-186.

RAJASHEKARA, G.; GLOVER, D. A.; KREPPS, M.; SPLITTER, G. A. Temporal analyses of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. **Cellular microbiology**, Oxford, [online], v.10, n. 7, p. 1459-1473, 2005.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by

matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, p. 543-551, 2009.

SCHLESINGER, S.; GUIMARÃES, E.; LERDA, D.; TEIXEIRA, E. **Pecuária Bovina no Brasil: Maior Produtividade com Menor Impacto Socioambiental**. Focus. 2010. Disponível em:<[http://www.visaobrasil.org/wp-content/uploads/2010/09/focus\\_julho2010\\_pecuaria1.pdf](http://www.visaobrasil.org/wp-content/uploads/2010/09/focus_julho2010_pecuaria1.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2013.

SCHNEEBERGER, C.; SPEISER, P.; KURY, F.; ZEULINGER, R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **PCR Methods and Applications**, n. 4, p. 234-238, 1995.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GOLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NOCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NOCKER, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 801-808, abr. 2010.

SILVA F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SAN TOS, R. L. Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n. 47, p. 1-12, 2005.

SILVA JUNIOR, F. F. **Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigoríficos pela sorologia, bacteriologia e PCR**. 2008. 64f. Tese. (Doutorado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of *Brucella*. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 17, n. 3, p. 209-230. Mar. 1990.

SOLA, M. C. **Emprego da técnica de PCR em Tempo Real na detecção de DNA de *Brucella* spp em lesões de carcaças e vísceras provenientes de matadouros-frigoríficos sob inspeção federal**. 97f. (Dissertação) Universidade Federal de Goiás, Escola de veterinária e zootecnia, Goiás, 2011.

SOUZA, F. G. **Desenvolvimento e avaliação da virulência residual de uma cepa mutante de *Brucella abortus***. 69f. (Dissertação) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, MS, 2009.

TaqManR Universal PCR Master Mix Protocol. n. Part Number 4304449. Foster City: Applied Biosystems, 2010.

THELWELL, N.; MILLINGTON, S.; SOLINAS, A.; BOOTH, J. AND BROWN, T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. **Nucleic Acids Research**. v. 28, p. 3752– 3761, 2000.

TONNA I, TONNA A. Brucellosis. **New England Journal Medical**. Sep. v. 8, n. 10, p. 1071-1072, 2005.

THOEN, C. O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N. F.; *Brucella*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p. 236-247, 1993.

USDA FOREIGN. Global Agricultural Information Network. Brazil, Livestock and Products Annual, Annual Livestock Report 2012. Disponível em: <[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_9-6-2012.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_9-6-2012.pdf)>. Acesso em: 19 abr. 2013.

VASSALLO, D. J. The saga of brucellosis: controversy over credit for linking Malta fever with goats' milk. **Lancet** Sep. v. 21, n. 348, p. 804-808, 1996.

VELASCO, J. C.; ROMERO, I.; LÓPEZ-GOÑI, J.; LEIVA, R.; DIAZ, AND MORIYÓN, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with close relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, p. 759–768, 1998.

VELASCO, J. J. A.; BENGOCHEA, K.; BRANDENBURG, B.; LINDNER, U.; SEYDEL, D.; GONZALEZ, U.; ZHRINGER, E.; MORENO, AND MORIYÓN, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 3210–3218, 2000.

VERAJANO RUBIAL, 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** [online]. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13072009-111831/pt-br.php>>. Acesso em: 27 de Ago. 2012.

VERGER, J. F.; GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, AND GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 35, p. 292–295, 1985.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathology immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of comparative pathology**. London, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, 2009.

WALKER, R. L. *Brucella* In: HIRSH, D.C.; EE, Y. C. (Ed.), **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

WHO - World Health Organization Joint FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. 2009.

WRAY C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. **Vet Bull**, v. 45, p. 543-550, 1975.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 821-842. Sep-Oct.1983.

ZARROUK, H.; KARIBIAN, D.; BODIE, S.; PERRY, M.B.; RICHARDS, J.C.; CAROFF, M. Structural characterization of the lipids A of three *Bordetella bronchiseptica* strains: variability of fatty acid substitution. **Journal Bacteriological**, p. 3756-3760, 1997.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

## Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR

Marrielen A.B. Caitano<sup>1</sup>, Cleber O. Soares<sup>2</sup>, Grácia M.S. Rosinha<sup>2\*</sup>, Carlos A.N. Ramos<sup>2</sup>, André L.J. Ferraz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte - Av. Rádio Maia, 830 – Zona Rural, Campo Grande - MS, 79106-550 <sup>3</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul<sup>1</sup>

### Abstract

The objective of this study was to detect *Brucella abortus* by polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR (qPCR) from bovine tissues with suggestive lesions of brucellosis. For this, 21 fragments of bovine tissues collected at abattoirs of Mato Grosso do Sul were processed and subjected to microbiological culture and extraction of genomic DNA to perform the PCR reactions and qPCR. Eight samples of microbiological culture showed bacterial growth and five samples were confirmed as *B. abortus* by PCR. DNA of *Brucella* (IS711 primers) was detected in 13 (61.9%) directly from tissue samples and 17 (81%) from tissue homogenate samples. With the species-specific set of primers *BruAb2\_0168F* and *BruAb2\_0168R*, 14 (66.0%) tissue samples and 18 (85.7%) tissue homogenate samples were positive. Nine positive samples in the species-specific PCR were sequenced and the best hit in the BLASTn analysis was *B. abortus*. By qPCR, 21 (100%) tissue samples and 19 (90.5%) tissue homogenate samples were positive for *B. abortus*. Ten samples of DNA from bovine blood from an accredited-free herd were used as negative control in PCR and qPCR analysis using the primers *BruAb2\_0168F* and *BruAb2\_0168R*, and no one amplified by PCR, whereas two samples were amplified by qPCR (20%). In conclusion, both techniques detect the presence of *B. abortus* directly from tissues and homogenized, but the qPCR showed high sensitivity. The results indicate that qPCR can represent an alternative tool for faster and more accurate detection of *B. abortus* directly from tissues, and use in health surveillance programs by presenting satisfactory sensitivity and specificity.

INDEX TERMS: Brucellosis, isolation, sequencing, extraction.

### Resumo

Objetivou-se no presente estudo detectar *Brucella abortus* por reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real (qPCR), a partir de tecidos bovinos com lesões sugestivas de brucelose. Para isto, 21 fragmentos de tecidos bovinos coletados em abatedouros de Mato Grosso do Sul foram processadas e submetidas ao cultivo microbiológico e extração do DNA genômico para realização das reações de PCR e qPCR. No cultivo microbiológico oito amostras apresentaram crescimento bacteriano e cinco foram confirmadas como *B. abortus* por PCR. Diretamente das amostras de tecido, DNA do gênero *Brucella* (oligonucleotídeos IS711) foi detectado em 13 (61,9%) amostras de tecido e 17 (81%) amostras de homogeneizado. Já com os oligonucleotídeos espécie-específicos *BruAb2\_0168F* e *BruAb2\_0168R*, 14 (66,0%) amostras de tecido e 18 (85,7%) amostras de homogeneizado foram amplificadas. Nove amostras positivas na PCR espécie-específica foram sequenciadas e o *best hit* na análise BLASTn foi *B. abortus*. Na qPCR 21 (100%) amostras de tecidos e em 19 (90,5%) amostras de homogeneizado foram positivas para *B. abortus*. Dez amostras de DNA de sangue bovino de rebanho certificado livre, foram utilizadas como controle negativo nas análises de PCR e qPCR utilizando-se os oligonucleotídeos *BruAb2\_0168F* e *BruAb2\_0168R*. Na PCR nenhuma amostra amplificou, enquanto que na qPCR 2 (20%) amplificaram. Conclui-se que as duas técnicas detectam a presença de *B. abortus* diretamente de tecidos e homogeneizados, porém a qPCR apresentou maior sensibilidade. Os resultados obtidos indicam que a qPCR pode representar uma alternativa rápida e precisa para a detecção de *B. abortus* diretamente de tecidos, e ser utilizada em programas de vigilância sanitária, por apresentar sensibilidade e especificidade satisfatórias.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, isolamento, sequenciamento, extração.

### Introdução

A brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acometem seres humanos, animais domésticos e silvestres em todo o mundo. As espécies deste gênero apresentam geralmente um hospedeiro preferencial, o que confere à brucelose características próprias de disseminação, ou seja, tem potencial de existir em diferentes ambientes, podendo adaptar-se a diferentes hospedeiros. (Nicoletti 1989, Boschioli et al. 2001, Walker 2003, Halling et al. 2005). *Brucella abortus* é o principal agente da brucelose bovina (Thoen et al. 1993, Acha & Szyfres 2003). No entanto, outras espécies como *Brucella suis* e *Brucella melitensis* também podem infectar os bovinos quando estes estão em contato com

<sup>1</sup> Mestranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felino Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia 830, Vila Popular, Campo Grande, MS 79106-550. \*Autor para correspondência: [rosinha@cnpqc.embrapa.br](mailto:rosinha@cnpqc.embrapa.br)

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Rodovia Aquidauana, Km 12, Aquidauana, MS 79200-000, Brasil.

suínos, caprinos e ovinos infectados (Acha & Szyfres 2003). Vale ressaltar que *B. melitensis* ainda não foi isolada no Brasil (Poester et al. 2002, Brasil 2006).

A brucelose bovina é uma doença infecciosa crônica responsável por importantes perdas econômicas à cadeia produtiva bovina, devido principalmente a abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos (Thoen et al. 1993, Acha & Szyfres 2003). Estima-se que a diminuição da produção de carne e leite por conta da enfermidade seja de 25%, e o decréscimo na produção de bezerros seja da ordem de 15% (Nicoletti 1989, Bernués et al. 1997, Miranda et al. 2008). Outras perdas importantes, mas de difícil mensuração, estão relacionadas à depreciação do valor dos animais oriundos de propriedades com brucelose, e os gastos relativos ao tratamento e à redução da atividade produtiva de pessoas infectadas.

O governo brasileiro por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (Brasil 2006). O programa consiste basicamente na identificação e eliminação de animais infectados. Sendo assim, a correta identificação desses animais é uma das bases do programa de controle e erradicação de brucelose bovina (Lage et al. 2005, Poester et al. 2005).

O diagnóstico direto da brucelose pode ser feito por meio de imunohistoquímica, isolamento bacteriano e pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Alton et al. 1988). O padrão ouro para o diagnóstico da brucelose é o isolamento (Alton et al. 1988). No entanto, este método exige tempo e muitos recursos, como instalações laboratoriais com nível de biossegurança 3 (NB-3) e pessoal técnico altamente qualificado.

Mais recentemente a Norma Interna SDA nº2/2012 do MAPA estabelece para fins de diagnóstico confirmatório, a coleta por meio dos Serviços de Inspeção Federal, e uso sistemático de amostras de carcaças de bovinos ou bubalinos com lesões sugestivas de brucelose. Em propriedades em que forem identificados focos ou suspeita de animais infectados, as carcaças serão retidas para exportação e os proprietários orientados ao saneamento do rebanho. Caso o resultado obtido seja negativo, os produtos retidos deverão ser liberados e a propriedade é novamente autorizada a enviar animais para abate com destino das carcaças aos mercados externos. Diante das exigências que surgem, associadas aos problemas apresentados pelo isolamento microbiológico, novos testes de diagnóstico devem ser avaliados e implementados, a fim de obter resultados mais precisos e em curto espaço de tempo.

A PCR é um método útil para o diagnóstico, pela rapidez, sensibilidade e especificidade. Além disso, possibilita a utilização de amostras em que os microrganismos foram inativados, tornando o diagnóstico mais seguro (Plikaytis et al. 1991, Ibrahim et al. 1992, Foster et al. 2008). Diversos métodos baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como o *AMOS-PCR*, *AMOS-ERY-PCR* e *PCR-Multiplex* (Bricker & Halling 1994), têm sido utilizados para identificação e classificação de espécies de *Brucella*, assim como diferenciação de biovars e cepas vacinais. Dentre as técnicas, a PCR em tempo real tem se destacado por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade em relação a PCR convencional (Hinich et al. 2009).

No presente estudo, o objetivo foi avaliar reações de PCR e qPCR para detecção de *B. abortus* diretamente em amostras de tecidos bovinos com lesões sugestivas. Espera-se com a presente avaliação, gerar subsídios para que o diagnóstico confirmatório de *Brucella abortus* em lesões sugestivas, possa ser realizado em menor tempo e com mais precisão do que o atualmente proposto pelo MAPA/Brasil (isolamento microbiano).

## Material e Métodos

**Amostras** - Foram utilizadas amostras de tecidos de 21 bovinos, sorologicamente positivos para *Brucella* spp., provenientes de diversas propriedades do Estado de Mato Grosso do Sul - Brasil. Os animais foram abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal da cidade de Campo Grande, no período de agosto de 2008 à julho de 2012. Os tecidos coletados foram pulmão (n=1), fígado (n=4) e ligamento cervical (n=16) que apresentavam lesões sugestivas de brucelose.

**Processamento e cultivo microbiológico das amostras** - As amostras de tecido foram identificadas e mantidas a -80°C no Laboratório de Engenharia Genética Animal e processadas no Laboratório de Biossegurança, ambos da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Para processamento, as amostras foram retiradas do freezer 24 horas antes do procedimento para descongelamento lento. Os tecidos foram acondicionados em placas estéreis e dissecados com auxílio de tesouras e pinças esterilizadas. Fragmentos de tecidos com aproximadamente 25 mg foram cortados sobre placas de *petri* descartáveis, e em seguida, foram transferidos para sacos de homogeneização e acrescidos de 200 mL de PBS pH 7,2 estéril. Foram homogeneizados usando o aparelho *Stomacher* (Modelo MC 1204, ITR, Brasil) por 5 minutos com 410 golpes/minuto. Após homogeneização 100 µL foram semeados em placas contendo meio *Trypticase Soy*

Agar (TSA), e tubos com *Trypticase Soy Broth* (TSB), acrescidos de *Brucella Selective Supplement* (HiMedia Laboratories FD 005) e 0,025 mg/ml de fungicida (anforicina B).

Os cultivos foram incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Durante sete dias, e observados diariamente para constatar se houve crescimento bacteriano. Ao final desse período, nos casos em que não houve crescimento bacteriano, novas placas contendo meio TSA foram inoculadas com 200 µL do caldo TSB mantido em crescimento por igual período. Após isso, as placas foram observadas por mais sete dias para a verificação de crescimento de colônias. Das colônias isoladas uma parte foi armazenada em meio de congelamento (meio BHI com adição de glicerol e água destilada) em criotubos e estocada a -80°C. A outra parte foi transferida para tubos do tipo *ependorff* contendo 1 mL de PBS. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.100 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspenso em 100 µL de Tris EDTA (TE - 10mM Tris HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8,0 ). Posteriormente as amostras foram inativadas a 100°C por 30 minutos para extração de DNA.

Paralelamente, amostras do homogeneizado (1 mL) obtidas no *stomacher* foram estocadas em criotubos e armazenadas a -80°C para posterior extração de DNA. Em seguida, 1 mL do homogeneizado foi centrifugado a 16.100 xg por 5 minutos, o sedimento foi ressuspenso e inativado conforme descrito anteriormente. Após a inativação o material foi armazenado a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

*Obtenção das amostras de tecido para extração de DNA* - fragmentos com aproximadamente 25 mg dos órgãos com lesão foram acondicionados em placas de *petri*, e acrescidas de 800 µL de PBS pH 7,2. Com o auxílio de uma pinça e bisturi os fragmentos de tecido foram totalmente cortados em fragmentos menores, deixando o material completamente macerado. Completou-se o volume para 1 mL com PBS e todo material foi transferido para um tubo tipo Eppendorf. Deste, foram retirados 200 µL do material e armazenado a -20°C para a realização da extração do DNA.

*Extração de DNA* - As amostras de tecido e homogeneizados foram previamente descongeladas e depois submetidas à extração de DNA genômico utilizando o *kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue®*, conforme o protocolo descrito pelo fabricante. E para as amostras provenientes de isolamento bacteriano, foi utilizado o método de extração por guanidina, descrito por Picher et al. (1989).

*Quantificação das amostras de DNA* - As amostras foram quantificadas em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000), e em seguida as concentrações foram ajustadas para 100 ng/µL.

*PCR convencional* - As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 µL. Cada reação contendo 100 ng de DNA, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pMol de cada oligonucleotídeos, 0,3 mM dNTP's e 1,5 U de taq DNA polimerase. Foram utilizados como alvo do experimento dois genes, sendo eles: *IS711* e *BruAb2\_0168* (Hinic et al. 2008), que identifica o gênero e a espécie *B. abortus*, respectivamente. As sequências dos oligonucleotídeos e o tamanho aproximado dos fragmentos encontram-se descritos na Tabela I.

Para os dois pares de oligonucleotídeos *IS711* e *BruAb2\_0168* as condições de termociclagem foram: 95°C por três minutos, seguindo de mais 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos. Ao final, uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos foi realizada. A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3% corado com *Sybr Gold* (Invitrogen) e visualizado em transluminador ultravioleta.

Como controle positivo das reações na PCR convencional, utilizou-se o DNA extraído das da cepa *B. abortus* S2308, adquirida de coleção biológica certificada e amostras de referência USDA B19 (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA), gentilmente cedidas pelo LANAGRO-MG (MAPA/Brasil). Como controles negativos, utilizou-se água DNase free estéril e DNA de sangue de animais negativos em testes sorológicos para brucelose.

*Clonagem e Sequenciamento* - Para a confirmação da especificidade da PCR foram sequenciadas 9 amostras positivas para os oligonucleotídeos *BruAB2\_0168*. Os fragmentos amplificados foram inseridas no vetor *pGEM-T* (Promega) e o plasmídeo recombinante foi sequenciado em ambas as direções pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977) em sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o *kit Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems®).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados por meio do software *BioEdit Sequence Alignment Editor* e posteriormente as sequências de nucleotídeos foram analisadas por meio da ferramenta online *BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool*, para busca de homologias.

*PCR em Tempo Real (qPCR)* - O ensaio realizado com os oligonucleotídeos *BruAb2\_0168* para amplificações espécie-específicas foi descrito por Hinic et al. (2008) e adaptado para este estudo. A reações foram preparadas em volume final de 12,5 µL contendo 100ng de DNA, 6,25 µL de *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix* (2x), 300 nM de cada oligonucleotídeos, 200 nM de sonda e 1,0 µL de água. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguidos de

40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata, em termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems, EUA).

Como controle positivo das reações, utilizou-se o DNA extraído das da cepa *B. abortus* S2308, adquirida de coleção biológica certificada e amostras de referência USDA B19 (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA), gentilmente cedidas pelo LANAGRO-MG (MAPA/Brasil). Como controles negativos, utilizou-se água DNase free estéril e 02 DNAs de sangue de animais negativos em testes sorológicos para brucelose.

Com o intuito de eliminar possíveis erros da técnica e evitar resultados falsos positivos, para interpretação dos resultados foram calculadas a média e desvio padrão de Cq para as amostras sorologicamente negativas, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram Cq 1,5 desvios padrão menor do que a média dos Cqs dos negativos.

Para avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR em tempo real, separadamente foram analisadas 10 amostras de DNA de sangue bovino proveniente da Embrapa Gado de Leite (Certificada livre de Brucelose e Tuberculose bovina), e 2 amostras referencia S2308 e USDA B19.

*Análise estatística* - Os resultados das reações de PCR e qPCR realizadas com os oligonucleotídeos *BruAb2\_0168*, utilizando os DNAs de tecido, homogeneizado e sangue bovino negativo, foram comparadas pelo teste Exato de Fisher. Um intervalo de confiança de 95% foi estabelecido.

## Resultados

*Isolamento Bacteriológico* - Das 21 amostras de tecidos processadas, oito (38%) apresentaram crescimento de colônias que apresentaram características de *Brucella* spp. como: coloração translúcida, bordas regulares, colônias com tamanho pequeno e crescimento entre quatro a sete dias em estufa de CO<sub>2</sub>. As colônias isoladas foram provenientes das amostras de fígado (3 amostras) e ligamento cervical (5 amostras).

*PCR convencional* - Das oito amostras isoladas, cinco foram positivas para gênero *Brucella* spp. e para espécie *B. abortus* por PCR. As três amostras isoladas que não apresentaram positividade na PCR para gênero e espécie também apresentaram características morfológicas semelhantes à *Brucella* spp.

Das 21 amostras de DNA analisadas, 13 (61,9%) amostras de tecido e 17 (81,0%) amostras de homogeneizado foram positivas para o gênero *Brucella*. E para a espécie *B. abortus*, 14 (66,0 %) amostras de tecido e 18 (85,7 %) de homogeneizado foram positivas. Nas 10 (100%) amostras de DNA de sangue bovino provenientes de MG não houve amplificação com nenhum dos oligonucleotídeos utilizados.

*Sequenciamento* - Todas as amostras sequenciadas apresentaram identidade de 99% com o acesso Genbank AE017224.1 de *B. abortus*.

*PCR em Tempo Real* - Nos teste das amostras de tecido, as amostras negativas, bem como o controle negativo (água) apresentaram sinal de fluorescência nos ciclos finais da PCR, a média e desvio padrão de Cq destas foram de 34,7 e 0,95, respectivamente. Desta forma, as amostras testadas foram consideradas positivas quando apresentaram Cq menor que 33,3. Por outro lado nos testes com amostras de homogeneizado não houve sinal de fluorescência nas amostras negativas e controle negativo, sendo que as amostras positivas apresentaram (Cq > 13,7). O fragmento do gene *BruAb2\_0168* amplificado por qPCR foi detectado nas 21 (100%) amostras de tecido e em 19 (90,5%) amostras de homogeneizado.

Nos testes de sensibilidade e especificidade as amostras de DNA de sangue de bovinos provenientes de propriedade certificada livre para brucelose bovina, apresentaram sinal de fluorescência menor do que a linha de corte em 8 das 10 amostras (80%). Por outro lado todos os controles positivos foram confirmados como tais.

*Análise estatística* - Ao teste Exato de Fisher não foi observada diferença significativa entre as duas técnicas (PCR e qPCR) para a detecção de *B. abortus* em amostras de homogeneizado. Em relação às amostras de tecido, a qPCR apresentou maior frequência de amostras positivas (p=0,0086) em relação a PCR convencional. Não foram observadas diferenças significativas entre os tipos de amostra em cada técnica (PCR ou qPCR) p>0,05.

## Discussão

Neste estudo foram avaliados ensaios de PCR e qPCR para detecção de *Brucella abortus* em amostras de tecidos com lesões sugestivas de brucelose, com o intuito de propor um diagnóstico *post mortem* rápido e preciso para a doença. Os resultados obtidos nos ensaios de PCR e qPCR foram comparados para avaliar a sensibilidade e especificidade das técnicas quanto a detecção de amostras positivas e negativas respectivamente. A utilização da técnica de qPCR com amostras de DNA de tecido,

tendo como alvo o gene *BruAb2\_0168*, mostra-se promissora para auxiliar no diagnóstico da brucelose, pois o gene citado é baseado em um único *loci* genético de *Brucella abortus*, mostrando ser espécie-específico.

Os ensaios de PCR e qPCR foram capazes de detectar um número maior de amostras positivas do que o cultivo microbiológico, que detectou apenas oito isolamentos. Após PCR com DNA extraído dos isolados microbianos, apenas cinco foram identificados como *Brucella* spp. e *Brucella abortus* (Tabelas II e III). A baixa sensibilidade do isolamento microbiológico tem sido relatada por outros autores (Bricker 2002, Navarro 2002), e geralmente é atribuída a diferentes técnicas de isolamento (meios de cultivos diferentes), tipos de amostras e viabilidade do organismo na amostra (Ilhan et al. 2008, Hinic et al. 2009).

Os 3 resultados positivos no isolamento e negativos na PCR podem ter ocorrido devido a falhas no processo de amplificação do DNA por PCR. Pois, o meio utilizado para o isolamento é específico e seletivo para *Brucella*, descartando-se a possibilidade de que possa ter havido confusão na identificação do microrganismo. A identificação microbiológica de isolados de *Brucella* pode ser feita por características morfológicas, PCR e testes bioquímicos (Alton et al. 2008) no entanto, este último não foi realizado no presente estudo.

Com relação aos tecidos para isolamento, PAULIN & FERREIRA NETO (2003) descrevem que os linfonodos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos, e principalmente os supramamários, são os tecidos em que *Brucella abortus* é mais frequentemente isolada. No presente estudo, o cultivo microbiológico foi realizado a partir de amostras de fígado e ligamento cervical e evidenciaram que outras amostras também podem ser fonte de estudo para detecção de *B. abortus*, principalmente quando apresentam lesão sugestiva.

A técnica utilizada para o cultivo microbiológico foi realizada de acordo com as metodologias empregadas para isolamento do patógeno (Alton et al. 1975, O'Leary et al. 2006). Para a obtenção das amostras descritas como homogeneizado e tecido, o procedimento se deu no momento do cultivo, onde homogeneizado é uma alíquota de PBS+tecido (mistura em *stomacker*), e tecido é um fragmento de órgão lesionado que foi separado em tubo eppendorff e processado posteriormente.

Não foi observada diferença significativa entre os tipos de amostras (tecido ou homogeneizado) utilizadas ( $p > 0,05$ ). No entanto, na PCR convencional, tanto com os oligos genéricos *IS711*, como específicos *BruAb2\_0168*, foi possível detectar maior número de ampliações nas amostras de DNA extraídas de homogeneizado, em relação as amostras de DNA de tecido. Isso pode ter acontecido devido a melhor homogeneização da amostra, que por sua vez resultou em um processo de lise mais eficiente durante a extração de DNA. Dessa forma, todas as unidades bacterianas presentes naquele fragmento de tecido, foram expostas e lisadas adequadamente. No tecido, por outro lado, a maceração ocorreu com o auxílio de pinça e bisturi. Esse processo resulta em fragmentos de tecidos maiores, e que por sua vez, limitam a eficiência da lise celular por não expor todas as células aos agentes lisantes. Na qPCR, uma maior frequência de resultados positivos foi observada com as amostras de DNA extraídas de tecido (21/21), em relação ao homogeneizado (19/21). Embora a qPCR possa ser influenciada pela qualidade das amostras de DNA tanto quanto a PCR convencional, é possível que a alta sensibilidade intrinsecamente associada a técnica, possa ter resultado em uma diferença casual.

Ao comparar as técnicas de PCR e qPCR com os oligos espécie-específicos, foi observado que a qPCR detectou de 90,5% (19/21) a 100% (21/21) das amostras de DNA positivas, apresentando maior sensibilidade em relação a PCR convencional que detectou de 66% (14/21) a 85% (18/21). Por outro lado, dentre as amostras provenientes de bovinos de propriedade certificada livre, a qPCR detectou 20% de resultados positivos (2/10), enquanto a PCR convencional não detectou qualquer resultado falso-positivo. No entanto, as duas amostras com resultado falso-positivo na qPCR apresentaram Cq de 31,6 e 32,5, muito próximo ao Cq limite estabelecido (33,3). Erros mínimos de pipetagem, até mesmo falhas no algoritmo de análise dos softwares, são apontados como possíveis causas de resultados falso-positivos em reações de qPCR (Dorak 2006).

Apesar de a qPCR ter apresentado um especificidade inferior a PCR quando amostras de sangue de bovinos "sadios" foi utilizada, em se tratando de amostras provenientes de animais sorologicamente positivos e com lesão sugestiva (foco do programa de monitoramento), essa diferença na especificidade deve ser desprezível.

Portanto, além de uma maior sensibilidade, a qPCR possibilita a obtenção de resultados mais rápidos (2 dias), em relação ao teste padrão ouro atualmente preconizado (isolamento microbiano) que necessita de ao menos 4 a 7 dias. Já com relação a PCR convencional, a qPCR tem como principal vantagem a maior sensibilidade, apesar de apresentar um custo superior.

Os resultados do presente estudo indicam que a qPCR espécie-específica baseada nos oligos *BruAb2\_0168*, pode ser implementada como um teste rápido para o diagnóstico de *B. abortus* em amostras de tecidos, contribuindo para a diminuição da exposição do laboratorista ao risco que o patógeno confere, e

possibilitando a obtenção de resultados mais rápidos. No entanto, recomenda-se que avaliações com maior número de amostras seja realizada para a validação definitiva da técnica.

### Agradecimentos

Ao CNPq e EMBRAPA Gado de Corte pelo financiamento do projeto e a Capes pelo financiamento da bolsa de estudos.

### Referências

Acha P.N. & Szyfres B. 2003. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Pan American

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory: Bacteriological methods. Paris. Inra. 190p.

Bernués A., Manrique E., Maza M.T. 1997. Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area of Spain. *Prev. Vet. Med.* 30:137-149.

Boschiroli M.L., Foulongne V., O'callaghan D. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 58-64.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**: Legislação. Brasília: 2006. 36-42 p.

Bricker B.J., Halling S.M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2660-2666.

Bricker B.J: PCR as a diagnostic tool for brucellosis 2002. *Vet. Microbiol.* 90:435-446.

Dorak M.T. 2006. Real Time PCR. Taylor & Francis Group.

Foster J.T., Okinaka R.T., Svensson R., Shaw K., De K.B., Robison R.A., Probert W.S., Kenefic L.J., Brown W.D., Keim P. 2008. Real-Time PCR Assays of Single-Nucleotide Polymorphisms Defining the Major *Brucella* Clades. *J. Clin. Microbiol.* 46: 296-301.

Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal Bacteriology* 187(8):2715-2726.

Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Z., Makaya P.V., 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. Metho.* 75: 375-378.

Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R., Abri C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Veterinary Research* 5: 1-8.

Ilhan Z., Aksakal A., Ekin I.H., Gülhan T., Solmaz H., Erdenlig S. 2008. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters. in Appl. Microbiol.* 46: 301-306.

Ibrahim A.W., Liesack and Stackebrandt E. 1992. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1942-1947.

Lage A.P., Poester F.P., Gonçalves V.S.P., Roxo E., Müller E.E., Cavalléro J.C.M., Ferreira-Neto J.S., Motta P.M.P.C., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R. 2005 Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. *Cad. Tec. Vet. Zootec.* 47:99-110.

- Miranda K.L., Alves C.M., Minharro S., Lobo J.R., Müller E.E., Gonçalves V.S.P., Lage A.P. 2008. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? Leite Integral 3:44-55.
- Navarro E., Escribano J., Fernandez J.Á., Solera J. 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. Immun. and Med. Microbiol. 34:147-151.
- Nicoletti P.L. 1989. Relationship between animal and human disease. In: E. J., Young; M. J. Corbel. (Eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida, p. 41-51.
- O' Leary S., Sheahan M., Sweeney T. 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Research in Veterinary Science 81: 170-176.
- Paulin L.M., Ferreira Neto J.S. 2003. O Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira. Jaboticabal: Funep, p. 154.
- Pitchern D.G., Saunders N.A., Owenn R.J. 1989. National Collection of Type Cultures and \*Division of Microbiological Reagents and Quality Control, Central Public Health Laboratory, London NW9 5HT, UK, Letters in Appl. Microbiol. 8:151-156.
- Plikaytis B.B., Eisenach K.D., Crawford J.T., and Shinnick T.M. 1991. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. Mol. Cell. Probes. 5:215-219.
- Poester F.P., Gonçalves V.S.P., Lage A.P. 2002. Brucellosis in Brazil. Vet. Microbiol. 90:55-62.
- Poester F.P., Samartino L.E., Lage A.P. 2005. Diagnóstico da brucelose bovina. Cad. Tec. Vet. Zootec. 47:13-29.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 74(12):5463-5467.
- Thoen C.O., Enright F., Cheville N.F. 1993. *Brucella*. In: Gyles CL, Thoen CO. (Ed.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2. ed. Ames: Iowa State University Press. p. 236-247.
- Walker R.L. 2003. *Brucella* In: HIRSH, D.C.; EE, Y. C. (Ed.), Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 185-191.

Tabela I. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar amostras de *Brucella* spp. e *Brucella abortus*.

Oligonucleotídeos	Sequência	Pares de base	Gene	Referência
<i>BruAb2_0168F</i>	5'GCACACTCACCTTCCACAACAA3'			Hinic et al.
<i>BruAb2_0168R</i>	5'CCCCGTTCTGCACCAGACT3'	81	<i>BruAb2_0168</i>	2008
Hinic <i>IS711 F</i>	5'GCTTGAAGCTTGCGGACAGT3'			Hinic et al.
Hinic <i>IS711 R</i>	5'GGCCTACCGCTGCGAAT3'	63	<i>IS711</i>	2008
Sonda	FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC- BHQ-1			

Tabela II. Detecção de *Brucella* spp. em amostras de tecidos com lesões. Cultivo microbiológico e ensaios de PCR com DNA dos isolados.

Método	Nº de animais	Amostras positivas	
		Nº	%
Cultivo microbiológico	21	8	38
PCR <i>IS711</i>	8	5	62,5
PCR <i>BruAb2_0168</i>	8	5	62,5

Tabela III. Detecção de *Brucella* spp e *Brucella abortus* com cultivo microbiológico e ensaios de PCR e qPCR.

Amostra	Isolamento TSA	PCR Convencional (IS711)			PCR Convencional (BruAb2_0168)			PCR em Tempo Real (BruAb2_0168)	
		TSA	Tecido	Homo.	TSA	Tecido	Homo.	Tecido	Homo
5	-	-	+	+	-	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	+	-	-	+	+	+
9	-	-	-	+	-	+	-	+	+
13	+	+	-	+	+	-	+	+	-
15	+	-	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	-	+	-	-	+	+	+
SI	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	-	-	+	+	-	+	+	+	+
34	-	-	+	+	-	-	+	+	+
35	-	-	+	+	-	+	+	+	+
36	-	-	-	+	-	+	-	+	+
37	-	-	-	+	-	+	+	+	+
38	-	-	+	+	-	+	-	+	+
39	-	-	+	+	-	+	+	+	+
40	-	-	+	+	-	+	+	+	+
41	+	-	-	-	-	-	+	+	+
42	-	-	+	-	-	+	+	+	+
44	-	-	-	-	-	-	+	+	-
45	+	-	+	-	-	+	+	+	+

+ = positivo - = negativo

## Anexos

Tabelas de contingência dos resultados das PCRs

**Amostras de Tecido**

PCR *BruAb\_0168*

		+		-
PCR <i>IS711</i>	+	11		2
	-	3		5

PCR *BruAb\_0168*

		+		-
qPCR <i>BruAb_0168</i>	+	14		7
	-	0		0

PCR *IS711*

		+		-
qPCR <i>BruAb_0168</i>	+	13		8
	-	0		0

Tabelas de contingência dos resultados das PCRs

**Amostras de Homogeneizado**

PCR *BruAb\_0168*

		+		-
PCR <i>IS711</i>	+	14		3
	-	4		0

PCR *BruAb\_0168*

		+		-
qPCR <i>BruAb_0168</i>	+	16		3
	-	2		0

PCR *IS711*

		+		-
qPCR <i>BruAb_0168</i>	+	16		3
	-	1		1