

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR ANTE MORTEM DE
Brucella spp. EM BOVINOS**

**ANTE MORTEM MOLECULAR DIAGNOSIS *Brucella* spp. IN
CATTE**

Anna Letícia Rigo Munhoz Louzan

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL**

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR ANTE MORTEM DE
Brucella spp. EM BOVINOS**

**ANTE MORTEM MOLECULAR DIAGNOSIS *Brucella* spp. IN
CATTE**

Anna Letícia Rigo Munhoz Louzan

Orientadora: Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

Co-orientador: 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

MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

2012

*Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem.*

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém*

*Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo*

Quem acredita sempre alcança!

(Renato Russo)

Ao Deus supremo...

À minha querida e amada família: Meu esposo Antonio João, meus pais Cláudia Helena e José Fernando, e minha irmã Larissa Helena, meus mais valiosos presentes de vida, que me dão força, segurança e coragem para nunca desistir dos meus sonhos...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pela dádiva da vida, por me fazer superar as adversidades e ter me abençoado para que este sonho nascesse e fosse adiante. Agradeço pela saúde, fé e perseverança que tem me dado. E principalmente, por ter sido meu suporte na busca de soluções para o que parecia impossível.

A minha mãezinha Nossa Senhora por ter clareado as minhas idéias e me ajudado a entender que nos momentos difíceis a oração é a melhor forma continuar a caminhada e vencer os obstáculos.

Meu maior agradecimento é dirigido ao meu esposo, aos meus pais e minha irmã que souberam entender por muitas vezes a minha ausência e por me mostrarem que acima de tudo existe um Deus que só quer o nosso bem e que espera apenas que façamos a nossa parte aqui na Terra, nos dedicando de coração a algo que nos foi confiado e procurando manter com as pessoas um vínculo amoroso que possibilite a troca de conhecimentos e experiências. Essas pessoas que eu amo tanto me ensinaram a importância do trabalho acadêmico com rigor e disciplina, propiciando-me a fundamentação básica, sem a qual este trabalho não teria sido escrito. Agradeço a cada um pela paciência infinita, apoio e amor.

À minha orientadora, Dra. Grácia Maria Soares Rosinha que me possibilitou concretizar o sonho em continuar a minha carreira científica, depositando em mim toda sua confiança e nunca deixando de acreditar na minha capacidade. Agradeço pela sua disposição e esforço para dar todas as condições físicas e laboratoriais para a execução deste trabalho, pela disponibilidade e esclarecimentos necessários para o meu desempenho e crescimento profissional e estando sempre disposta a me ajudar nos momentos difíceis. Muito obrigada por todo apoio e amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Cléber pelos preciosos conhecimentos a mim concedidos e pela confiança depositada.

A Dra. Carina Elisei de Oliveira que sempre esteve disposta a ajudar, ouvir e discutir qualquer questão.

À Sra. Marinalva pelas conversas que sempre me deram força nos momentos em que precisei, pelas brincadeiras e seu bom humor na limpeza dos laboratórios.

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade. A todos os professores, que compartilharam comigo seus conhecimentos em busca de contribuir com o meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Embrapa Gado de Corte, em especial ao laboratório de Engenharia Genética Animal onde pude realizar meus experimentos. Aos pesquisadores que sempre estiveram dispostos a ajudar, ouvir e discutir qualquer questão.

A todos os meus queridos amigos com quem tive a oportunidade de conviver no laboratório durante todo esse período. Por sempre me apoiarem, mas principalmente, pela amizade, alegria, companheirismo e união. De modo especial gostaria de agradecer as minhas amigas, Renata, Mônica, Marrielen e Aline que sempre estiveram dispostas a me ajudar nos momentos em que precisei e caminharam sempre comigo, tanto nos momentos das risadas como também nos momentos de dificuldade. Não poderia esquecer do Namor, que com sua paciência sempre se colocou de prontidão para me ajudar, principalmente com os seus conhecimentos em estatística e medicina veterinária.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1. Histórico.....	3
1.2. Agente etiológico.....	4
1.3. Prevalência.....	5
1.4. Importância econômica.....	6
1.5. Transmissão e patogenia.....	7
1.6. Resposta imune.....	9
1.7. Controle.....	10
1.8. Diagnóstico.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
APÊNDICE.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional para *Brucella* spp.....31

Tabela II. Resultado dos testes sorológico (AAT) e molecular por meio da técnica de PCR convencional para *Brucella* spp. utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BCPS31, BruAb_0168, Ery 1 e Ery 2 com DNA extraído de sangue de bovinos.....31

.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos BCPS31F/BCPS31R, de DNA extraído do sangue de bovinos..... 32
- Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 3% da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos BruAb_0168F/ BruAb_0168R, de DNA extraído do sangue de bovinos..... 32
- Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Ery1/Ery2, das amostras de DNA padrão.....33
- Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Ery1/Ery2, de DNA extraído do sangue de bovinos.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL – microlitro

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desorribonucleotídeo trifosfatado

et al. – e colaboradores

g – grama

LPS – lipopolissacarídeo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL – mililitro

ηm – nanomol

OIE – Organização mundial de saúde animal (*World Organisation for Animal Health*)

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PIB- Produto Interno Bruto

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose

Taq – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

INTRODUÇÃO

A pecuária bovina tem grande importância no contexto econômico nacional, sendo responsável pelo grande aumento do Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário (CEPEA, 2008). Para que o Brasil continue apresentando bons resultados relacionado à cadeia de produtos de origem bovina, é importante o investimento na sanidade desses animais, devido a crescente demanda dos mercados consumidores por alimentos de maior qualidade nutricional e sanitária (THOMPSON et al., 2002).

A brucelose é uma das doenças infecciosas de maior impacto econômico negativo na cadeia produtiva da carne e do leite, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais, com consequente diminuição da produção do rebanho. A ocorrência de abortos acarreta um aumento do intervalo entre partos que leva à diminuição da produção de leite e associados aos abortos, a alta frequência de natimortos e bezerros nascidos fracos, que geralmente morrem ou têm seu crescimento prejudicado, reduzem o número de bezerros disponíveis para comercialização (MIRANDA et al., 2008).

Uma das principais zoonoses, a brucelose é causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella* que pode acometer seres humanos, animais domésticos e silvestres. O gênero contém diversas espécies que são definidas principalmente com base na especificidade ao hospedeiro, sendo que a maioria pode infectar seres humanos e a patologia se difere de acordo com a gravidade (NICOLETTI, 1989; WALKER, 2003).

Devido aos prejuízos à pecuária e pela transmissão da doença dos animais para o homem, desde o início do século XX, muitos países têm adotado medidas na tentativa da sua erradicação (POESTER, 2009).

No Brasil, o MAPA reconheceu a necessidade de definir uma estratégia de controle da brucelose e tuberculose e, para tratar deste assunto foi constituído um grupo de trabalho que elaborou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2000).

Dois focos principais fundamentam o PNCEBT com relação à brucelose bovina: o diagnóstico, baseado em técnicas sorológicas, e a vacinação. Medidas estas pelos quais é possível reduzir ou prevenir a exposição dos animais ao agente infeccioso e aumentar a resistência dos rebanhos.

O diagnóstico de uma enfermidade é fundamental para se estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização do agente. Nesse contexto, a brucelose pode ser diagnosticada através do diagnóstico clínico que se baseia na presença de sinais como aborto, nascimento de bezerras fracas, retenção de placenta e esterilidade de machos; o epidemiológico baseando-se no histórico dos rebanhos e o laboratorial, no isolamento e identificação do agente etiológico, na detecção do DNA dos microrganismos, e na presença de anticorpos nos fluidos orgânicos.

No diagnóstico da maioria das doenças infecciosas o fator mais importante é o isolamento por meio do cultivo, com posterior identificação do patógeno. Porém no caso da brucelose, isso é um processo muito lento exigindo tempo para o isolamento e identificação do agente (7-14 dias), além de ser trabalho perigoso, por se tratar de zoonose com alto risco de infecção humana (MOLNÁR et al., 1997; JARDIM et al., 2006).

Dessa forma, a técnica molecular reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvida para o diagnóstico rápido da brucelose (LIM et al., 2008).

Quanto à vacinação, até o momento, apenas as vacinas vivas atenuadas B19 e RB51 desencadearam proteção, sendo amostra vacinal B19 de *B. abortus* a estratégia essencial nos programas de controle da brucelose bovina, a mais amplamente utilizada em alguns países. Por ser uma amostra lisa, ela apresenta como as amostras lisas de *Brucella* spp. a cadeia O em seu lipopolissacarídeo (LPS), podendo dessa forma inferir no diagnóstico sorológico (CHEVILLE et al., 1993) além de poder infectar o homem, ocasionar orquite e epididimite nos machos e abortos em fêmeas vacinadas em final da gestação (BRASIL, 2003).

Sua identificação pela PCR está baseada em um gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*) e este tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação de B19 das amostras de campo (EWANT; BRICKER, 2000).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a técnica de PCR como um diagnóstico *ante mortem* para identificar *Brucella* spp. em sangue de bovinos pertencentes à região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul, e, diferenciá-las em amostra de campo ou vacinal B19.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Histórico

A brucelose é uma antropozoonose conhecida desde o tempo de Hipócrates. Em 450 a.C., já havia relatos de doença com características semelhantes à brucelose. As primeiras pesquisas sobre brucelose foram feitas por Marston, em 1859, quando contraiu a enfermidade na Ilha de Malta. Outros estudos descreveram como doença crônica debilitante com complicações de reumatismo em marinheiros durante a guerra da Criméia, e mais tarde em Malta, David Bruce isolou e descreveu a presença de *Micrococcus melitensis* no baço de quatro soldados ingleses, acometidos de Febre do Mediterrâneo ou Febre Ondulante, devido à ingestão de leite cru de cabras. Em homenagem a Bruce, a espécie foi renomeada para *Brucella melitensis*. (BRUCE, 1887; NICOLETTI, 2002; RUST, 2010).

O médico Themistocles Zanmit juntamente com sua equipe encontraram aglutininas em sangue de cabras e isolaram a bactéria de sangue e leite dessa espécie de animal. No ano de 1879, Wright e Smith desenvolveram o teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) para o diagnóstico.

Concomitantemente com o achado de David Bruce, Nocard em 1885, já haviam observado numerosos organismos cocóides em casos de abortos em bovinos e no ano de 1897, na Dinamarca, Bernhard Bang e Stribolt cultivaram e isolaram o agente dos abortos, denominando-o de *Bacillus abortus bovis* e relacionaram ao aborto infeccioso, batizando como a doença de Bang (ISHIZUKA, 2004; MANTUR, 2004). Mais tarde Bernhard Bang descreveu o agente causador da brucelose no gado e chamou de *Bacillus abortus*.

No ano de 1920, Mayer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* e Huddleson em 1923 classificou as três espécies nesse gênero: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis* (NICOLETTI, 2002).

No Brasil, o primeiro estudo sobre brucelose bovina foi realizado pelo professor Manoel Gonçalves Carneiro, em 1913, descrevendo um caso em humano (POESTER et al., 2002). Em 1931, Sílvio Torres verificou a existência de 8 animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados. Em consequência, em 1933 César Pinto propôs a implementação de um protocolo de testes em animais importados como forma de impedir a disseminação da doença no país (BOLETIM, 1988).

Thiago de Mello, em 1950, relatou a prevalência de 10% a 20% de brucelose bovina por todo país. (OIE, 1987; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

1.2. Agente etiológico

As bactérias do gênero *Brucella* são intracelulares facultativas, pertencentes à família Brucellaceae, da ordem Rhizobiales e da classe Alphaproteobacteria (VERGER et al., 1985). Apresentam-se como cocobacilos gram negativos, não capsuladas, não esporuladas, aeróbicas ou microaerófilas, imóveis, e não possuem fatores clássicos de virulência, tais como exotoxina, enzimas citolíticas, fímbrias, flagelos ou cápsulas (CARDOSO, 2006).

Podem ser encontradas em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa, dependendo da constituição química da parede celular. lipopolissacarídeo (LPS). Quando a molécula de LPS possui os dois domínios, a porção antigênica cadeia O e a porção tóxica lipídeo A, ela é completa. A molécula completa de LPS está presente nas colônias lisas de *Brucella* e tem relação com a virulência, mas não se encontra presente nas colônias rugosas. Estas não apresentam o antígeno-O e a molécula de LPS é incompleta (SMITH; FICHT, 1990; CAMPAÑA et al., 2003).

Dentro do gênero *Brucella* são descritas dez espécies independentes, e mesmo não sendo espécie específica, cada uma apresenta um hospedeiro preferencial: *B. melitensis* em (caprinos); *B. abortus* (bovinos); *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos); *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. canis* (cães); *B. ceti* (golfinhos e baleias); *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos) *B. microti* (roedor *Microtus arvalis*) e *B. inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010).

As bactérias do gênero *Brucella* se reúnem em dois grupos distintos: as lisas constituídas por *B. abortus* (8 biotipos), *B. suis* (5 biotipos) e *B. melitensis* (3 biotipos) e as rugosas, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*, que embora apresentem variantes não se subdividem em biotipos (METCALF et al., 1994). A classificação em biotipos ou tipos diferenciados bioquimicamente ocorre em função das necessidades de CO₂, produção de H₂S, crescimento em presença de fucsina ou tionina (MOLNÁR, 1997). No Brasil foram isolados *B. abortus* (biotipos 1, 2 e 3) e *B. suis* (biotipo 1) e identificados infectando animais domésticos, *B. canis* e *B. ovis*, e o principal agente da brucelose caprina, *B. melitensis* ainda não foi identificada no Brasil (BRASIL, 2003).

As espécies do gênero *Brucella* utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol para promover seu crescimento. O eritritol é um poliálcool de quatro carbonos, que serve como fonte de energia para *B. abortus*, foi cristalizado a partir do líquido amniótico e alantoidiano bovino (PEARCE et al., 1961) e sua via metabólica depende dos genes do operon *ery* que codificam enzimas importantes na transformação desse álcool.

1.3. Epidemiologia

A brucelose bovina apresenta distribuição mundial, com exceção do Japão, Austrália, Nova Zelândia e de vários países europeus onde foi erradicada (MONTEIRO, 2004), porém tem se tornado um problema re-emergente em muitos países da América do Sul, Oriente Médio, Ásia e África (CORBEL, 1997; OIE 2009).

O Brasil detém hoje o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 180 milhões de cabeças. A maior parte está concentrada na região Centro-Oeste, que possui o maior rebanho nacional com cerca de 55 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2011). A brucelose é endêmica no país, pois apresenta dados diferenciados à dimensão territorial e às características próprias de cada região (POESTER et al., 2002; LAGE et al., 2008) gerando grandes diferenças na prevalência da patologia entre as regiões, os Estados e mesmo diferenças regionais dentro destes (BRASIL, 2000).

De acordo com um estudo epidemiológico realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 1975, a brucelose bovina encontrava-se disseminada por todo território brasileiro e foi observada a prevalência de 2% na região Nordeste, 4% na região Sul, 4,1% na região Norte, 6,8% na região Centro-Oeste e 7,5% na região Sudeste. Os dados oficiais sobre notificação indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5%, no período de 1988 a 1998 (POESTER, 2002; BRASIL, 2006).

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

Já no Pantanal do Mato Grosso do Sul, região com características peculiares de clima, topografia, hábitos e manejo de rebanho (PELLEGRIN et al., 1999), em estudos feitos pela

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no período de 1982-1984 (CAVALLÉRO, 1998), e na mesma região, no período de 1995-1997 (PELLEGRIN, et al., 1999) indicaram soroprevalências de 10,2% e 3,4%, respectivamente.

A prevalência desta doença no rebanho nacional gera barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos diretos e indiretos, por tratar-se de uma enfermidade transmissível, importante no ponto de vista socioeconômico e sanitário em nível nacional e com significativa repercussão no comércio internacional de animais e produtos (OIE, 2008).

1.4. Importância Econômica

A brucelose bovina parece ser a que assume maior importância economicamente (REIS, 1977). Uma vez instalada a doença no rebanho, além da queda na produção animal, a brucelose faz com que os produtos originados dessa atividade, como leite e a carne, fiquem vulneráveis às barreiras sanitárias, sofrendo depreciação no mercado internacional (SILVA; ITAVO, 2002).

Nos bovinos, a brucelose acomete de modo especial o trato reprodutivo, gerando perdas diretas devido aos abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção leiteira, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. Gerando uma redução de 15% na produção de bezerros, aumento no intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, diminuição de 25% de carne e leite, período de esterilidade temporária ou infertilidade, e a desvalorização comercial dos animais considerados infectados (BRASIL, 2006).

No Brasil não existem estudos recentes sobre os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina. Em 1971 o MAPA estimou um prejuízo de US\$ 32 milhões/ano em decorrência apenas do abortamento e queda da produção leiteira (POESTER al., 2002). Em dados coletados no período de 2001 e 2002 em Estados do Centro-Oeste, Sul e Sudeste brasileiro, observou-se um prejuízo entre pequenas e médias propriedades de 5% a 14% por ano, computando perdas de produtividade, gastos com medicamentos e assistência veterinária, abortamentos, mortalidade e descarte/reposição de animais (LUCAS, 2006).

Dentro das perdas indiretas, devem-se salientar as que resultam em infecções humanas. Na maioria das vezes, quando a enfermidade não é tratada na fase aguda, o curso crônico da doença no homem produz perdas relacionadas com os custos do diagnóstico e tratamento, muitas vezes requerendo internações prolongadas. Além disso, não deve ser esquecido o custo do período decorrente da ausência ao trabalho (SANTOS et al., 2005).

1.5. Transmissão e patogenicia

A infecção com *Brucella* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa nasal, oral ou conjuntiva. Após a penetração, a bactéria é transportada livre ou dentro de células fagocíticas para os linfonodos regionais, onde ocorre hiperplasia e inflamação e, podem permanecer por semanas a meses (BATHKE, 1988; BISHOP et al., 1994). Caso as bactérias sobrevivam no interior dos linfonodos, ocorre via corrente sanguínea a disseminação por todo o organismo, direcionando-se para órgãos ou tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como fígado, baço, medula óssea e articulações (THOEN et al., 1993; MONTEIRO, 2004).

Os macrófagos são considerados como as principais células de residência no hospedeiro para este patógeno. No interior de macrófagos, o vacúolo contendo a *Brucella* não opsonizada inibi a fusão do fagossomo com o lisossomo (CELLI; GORVEL, 2004) e segue o tráfego intracelular, evitando a destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (PIZARRO- CERDÁ et al., 1998) sobrevivendo dentro de macrófagos e facilitando sua disseminação e permanência no organismo (GORVEL; MORENO, 2002).

A transmissão da brucelose bovina faz-se principalmente pelos fetos abortados, envoltórios fetais, as descargas vaginais de fêmeas infectadas, água e alimentos como pastos, forragens, contaminados pelas membranas fetais, excreções vaginais, fezes e leite (CAMPOS et al., 2003). Há um favorecimento da transmissão de brucelose pelo próprio hábito dos bovinos de lambar e cheirar as crias ou fetos abortados por outros animais (NICOLETTI, 2002; MINHARRO, 2009).

A participação dos machos na transmissão da brucelose pela monta natural é pequena não se caracterizando como a forma mais frequente, embora a maioria das espécies de *Brucella* spp. seja encontrada no sêmen. Na monta natural o sêmen é depositado na vagina

onde existem defesas inespecíficas que dificultam o processo de infecção. Entretanto, cuidados especiais devem ser tomados na inseminação artificial, pois o touro infectado não pode ser utilizado como doador de sêmen, pois introduzido diretamente no útero, onde não existem barreiras inespecíficas, irá contaminar a fêmea com a bactéria (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

O gênero *Brucella* tem a capacidade de sobreviver no ambiente, mas não de multiplicar-se no mesmo, para isso necessita de sombra, umidade, baixas temperaturas e pH neutro (BRASIL, 2006; OIE, 2009). No organismo do hospedeiro a bactéria tem predileção por órgãos em que há maior disponibilidade de elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol, presente no útero gravídico, tecidos mamários, tecidos ósteo articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

Na primeira gestação do animal após a infecção, as bactérias atingem o útero e a partir do quarto mês de gestação a concentração de eritritol eleva-se atingindo níveis máximos próximos ao parto, estimulando a multiplicação da bactéria de forma crescente, provocando o aborto (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993; BISHOP et al., 1994). Na segunda gestação após a infecção o aborto é menos frequente e muito raro a partir da terceira gestação (CORBEL et al., 2006) isso devido a uma resposta imune, principalmente celular que diminui a área e a intensidade das lesões. Dessa forma, a manifestação clínica passa a ser o nascimento de bezerros fracos (NICOLETTI 1990).

No homem, a brucelose pode ser adquirida pelo contato com animais infectados (material contaminado de aborto e restos de placenta) ou mais frequentemente pelo consumo de leite e seus derivados contaminados e vacinas vivas atenuadas (NICOLETTI, 1989; DOMINGUES; LANGONI, 2001).

1.6. Resposta imune

O sistema imune é a capacidade do organismo de reconhecer substâncias, considerá-las estranhas e promover uma resposta contra elas, tentando eliminá-las.

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus* envolve tanto a resposta inata como a adaptativa. A imunidade inata é a primeira defesa do organismo com atuação imediata contra o patógeno, reconhecendo-o por meio de receptores específicos, denominados receptores do tipo “TOLL” localizados na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs). A ligação dos receptores a este patógeno induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa (WERLING; JUNGI, 2003).

A imunidade adaptativa trata-se de uma resposta específica para *B. abortus*, é mediada por linfócitos B e T que reconhecem os patógenos por meio de receptores de alta afinidade. No entanto, o estabelecimento da imunidade adaptativa é lento porque depende da ativação de genes, da síntese de proteínas e da proliferação celular.

A resposta celular envolve tanto a ativação das células T CD4+ e CD8+, responsáveis pela produção de interferon- γ (IFN- γ) (BALDWIN; GOENKA, 2006) um componente crucial da imunidade que resulta na sobrevivência do hospedeiro e, portanto, a manutenção do estado crônico infeccioso. A produção de IFN- γ resulta da possibilidade dos componentes de *Brucella* interagirem com os receptores *Toll-like* para a produção de IL-12 e TNF- α , embora a regulação da produção de IL-10 também seja produzida e diminua o controle de a infecção.

Na resposta humoral, cabe lembrar a composição química da bactéria de morfologia lisa, a qual possui o LPS com a cadeia O. Os anticorpos dirigidos contra o LPS de bactérias lisas do gênero *Brucella* têm sido bastante estudados, de modo especial por serem detectados com facilidade em provas sorológicas. A produção de anticorpos IgM, aparece inicialmente após a infecção e IgG quando o estado infeccioso é crescente, ativo ou crônico. Quando se trata de estímulo vacinal em fêmeas bovinas, o organismo também sintetiza anticorpo IgM e IgG, porém as IgG originadas pela vacina tendem a desaparecer cerca de seis meses após a vacinação (CAMPAÑA et al., 2003).

1.7. Controle

De acordo com as necessidades do controle da doença, a implementação de programas bem sucedidos de erradicação tem sido necessário, porém esses programas muitas vezes são caros, longos e difíceis de ser realizados devido a varias condições. A maior dificuldade é em relação à política de gestão nas propriedades com criação extensiva, deslocamento dos animais, existência de varias espécies de animais, entre outras. (GODFROID et al., 2011).

O MAPA iniciou, no ano 2000, o processo de elaboração de uma proposta de programa para o controle da brucelose e da tuberculose animal e foi constituído um grupo de trabalho que elaborou o PNCEBT. Os objetivos principais deste programa são o aumento da eficácia das medidas de combate à brucelose e à tuberculose, promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor, diminuir os impactos negativos das duas zoonoses na saúde pública, modernizar as cadeias produtivas de leite e de carne para o aumento da produtividade, promover a competitividade da pecuária nacional e, em consequência, ofertar ao mercado internacional produtos de melhor qualidade, gerando divisas para os produtores e para o país (BRASIL, 2000).

As vacinas vivas atenuadas são utilizadas nos programas de controle da brucelose. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde animal (OIE) são empregadas: a amostra B19 e RB51.

A vacina B19 foi e continua sendo largamente empregada em programas de controle da brucelose em vários países. O seu grau de proteção pode variar dependendo da idade da fêmea, via de aplicação, dose da vacina, dose de desafio, mas, se utilizada de forma convencional, protege de 60% a 75% contra o abortamento. Admite-se que fêmeas vacinadas com a B19 na idade correta estarão protegidas por um período de até sete anos (BATHKE, 1988).

A vacinação com a amostra viva atenuada B19, é realizada em fêmeas de 3 a 8 meses de idade, para que a reação vacinal decresça antes da maturidade sexual, pois a resposta imune é difícil de ser distinguida da infecção natural (REDMAN et al., 1967; RIBEIRO et al., 1997). A presença do LPS com a cadeia O na amostra lisa B19, explica o aparecimento e a persistência dos anticorpos no soro após a vacinação, os quais são detectados nos testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de brucelose, dificultando a diferenciação entre animais infectados e vacinados (CAVALLÉRO, 1998), devido à produção de anticorpos que

não podem ser distinguidos dos anticorpos induzidos pela amostra a campo *B. abortus* (SCHURING et al., 2002).

A amostra vacinal B19 sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702pb, conseqüentemente a enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase que faz parte do catabolismo do eritritol, encontra-se ausente na amostra vacinal B19, causando a acumulação do produto tóxico intermediário D-eritrose 1-fosfato e uma depleção no níveis de ATP, inibindo o crescimento bacteriano (SANGARI et al., 2000).

A vacina RB51 é uma amostra mutante de *B. abortus* resistente a rifampicina, de morfologia rugosa, destituída de cadeia O, não induz a produção de anticorpos anti-cadeia O, que são detectados em testes sorológicos convencionais usados no diagnóstico de brucelose (SCHURIG et al., 2002).

Experimentos a campo demonstram que tanto em áreas de baixa como de alta prevalência a imunidade induzida pela RB51 é similar ou melhor que da B19. Todas as espécies examinadas se manifestam sorologicamente negativas em testes convencionais após a vacinação com RB51 (SCHURIG et al., 2002) verificou-se que fêmeas gestantes podem com segurança ser vacinadas com RB51, via subcutânea, sem subsequente aborto (PALMER et al., 1997) apresentando uma capacidade reduzida de produzir aborto mesmo sendo uma amostra atenuada (CAVALLÉRO, 1998).

1.8. Diagnóstico

A brucelose pode ser diagnosticada pela identificação do agente por métodos diretos, como isolamento e cultura do agente; pela detecção do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por métodos indiretos pela detecção de anticorpos contra as espécies de *Brucella* (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2004).

O número de testes indiretos que são disponíveis para a brucelose é amplo, eles são baseados na presença de anticorpos nos soros e nos fluídos corporais. Cada país, segundo suas disponibilidades e suas características, deve escolher aqueles que melhor se adaptam a sua estratégia. Os testes para diagnóstico indireto reconhecido como oficiais são: antígeno acidificado tamponado (AAT) e o teste de anel em leite (TAL), como prova de triagens. Já

como testes confirmatórios estabeleceu o teste 2-Mercaptoetanol (2-ME) e a reação de fixação do complemento (FC) para detecção de antígenos pelo emprego de anticorpos específicos (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo de animais infectados, baseando-se em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana externa (MINHARRO, 2009). De certa forma, não apresentam sensibilidade absoluta, devendo-se normalmente associar várias técnicas para aumentar o número de animais detectados. Animais recentemente infectados ou com a infecção crônica podem não ser detectados por essas técnicas (COSTA, 2001).

Já a bacteriologia que envolve o isolamento e cultura do agente é um dos métodos diretos, ela é considerada o teste padrão-ouro, possui a vantagem da sua alta especificidade e capacidade de identificar diferentes espécies e biovars do agente (LAGE et al., 2008). No entanto, traz grandes riscos de infecção para o executor, pois o microrganismo pode se dispersar pelo ar e ser inalado, desta forma se faz necessário à utilização de equipamentos adequados de proteção (NEWBY et al., 2003; PROBERT et al., 2004) e, a identificação das espécies de *Brucella*, a partir de cultivo em meio bacto-triptose, requer no mínimo uma semana para obtenção de um resultado (OIE, 2008).

A detecção do DNA do agente bacteriano pela PCR apresenta enorme rapidez e sensibilidade, além da grande vantagem de detectar pequenas quantidades de microrganismos em materiais como abortos, sangue e sêmen, sem a necessidade de estarem viáveis, como na cultura bacteriológica (FEKETE et al., 1992; JÚNIOR, 2008).

Na PCR utilizam-se genes alvos: como a sequência de gene *16S* rRNA (HERMAN; RIDDER, 1992), *16S-23S* região inter-gênica e genes funcionais (DA COSTA, 1996), genes que codificam proteínas externas de membrana (BAILEY et al., 1992; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; BARREIRA-SALDANÃ et al., 1996; DA COSTA, 1996; FEKETE et al., 1990; GUARINO et al., 2000), e gene ligado a síntese do eritritol (BRICKER; HALLING, 1994). Para a diferenciação das espécies e biovars de *Brucella*, a PCR baseia-se no tamanho do fragmento amplificado (BRICKER; HALLING, 1994; QUIEPO-ORTUÑO et al.)

REFERÊNCIAS

- ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, p. 376, 2011.
- BALDWIN, C.; GOENKA, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella* : does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? **Critical Reviews Immunology**, v. 26, p. 407-442, 2006.
- BARREIRA-SALDANÃ, H. A.; SIFUENTES-RINCÓN, A. M.; REVOL-DE MENDOZA, A. Diagnosticó de brucellosis por la reacción en cadena de la polimerasa. **Gaceta Médica de México**, v. 132, p. 300-302, 1996.
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsioses, micoplasmose. (Ed.): Roca, v. 2, p. 144-160, 1988.
- BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Texas: University Press, College Station. v. 2, p. 1053-1066, 1994.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Brasília, v. 22, p. 1-4, 1988.
- BRASIL. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT: versão preliminar. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2003.
- BRASIL. Brucelose bovina. **Boletim da Defesa Sanitária Animal**, Brasília, v. 29, p. 41-47, 2000.
- BRASIL. Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 06 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, Página 6 de 12 de janeiro de 2004.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Manual técnico**. Brasília, DF, p.184, 2006.
- BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2660-2666, 1994.
- BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. **Practitioner**, v. 39, p. 161-170, 1887.

CAMPAÑA, R. C.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUKA, M. M. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. **Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo**, 2003.

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

CARDOSO, P.G. et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbiology Cell Factories**, v. 23, p. 5-13, 2006.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycobiology**. (Ed.) Philadelphia: London, p. 196-201, 1991.

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

CELLI, J; GORVEL, J. Organelle robbery: brucella interactions with the endoplasmic reticulum. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p. 93-97, 2004.

CEPEA. Centro de Estudos Avancados em Economia Aplicada. Pib do agronegócio. Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/other/Pib_Cepea_94_07.xls. Acesso em: 30 maio 2008.

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

CHEVILLE N. F. et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1591-1597, 1993.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: International conference on emerging zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 213-221, 1997.

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

COSTA, M. Brucelose bovina e equine. Doenças de ruminantes e equinos. (Ed.) Varela: São Paulo, v. 1, p.-187-197, 2001.

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

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. Manejo sanitário animal. Rio de Janeiro: publicações biomédicas, p. 205, 2002.

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

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

FEKET, A. et al. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7778-7783, 1992.

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

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

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

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

ISHIZUKA, M.M. Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina. (Ed.) Masaio Assessoria Científica: Sao Paulo, 30 p, 2003. 2003. 30p.

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

JÚNIOR, F. F. S. Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigorífico pela sorologia, bacteriologia e PCR. (online). Tese (Doutorado em Saúde Animal, Saúde Pública, Veterinária e Segmento Alimentar) – Universidade Estadual de São Paulo, 77p, 2008.

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

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

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

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, p. 188-202, 2007.

METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. Brucellosis: In: Beran G.W. & Steele J.H. (ed). Handbook of zoonoses. section a:bacterial, rickettsial, clamydial and mycotic. (Ed.) Boca Raton, p. 9-39, 1994.

MINHARRO, S. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isolados de bovinos no Brasil (online). Tese (Doutorado em Ciencia Animal - Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 77p, 2009.

MIRANDA, K.L. et al. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? **Leite Integral**, v.3, p. 44-55, 2008.

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

MONTEIRO, L. A. R. C. Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**. p. 89-90, 2004.

NEWBY, D. T.; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5' 3'-exonuclease and hybridisation probe assay. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 4753–4759, 2003.

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

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

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

OIE. Brucelose bovina, ovina y caprina. **Office International des Epizooties**. Série técnica, v. 6, p. 282, 1987.

OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. **Office International de Epizooties**, 5. Ed. Paris, p. 328-345, 2008.

PALMER, M.V.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 472-477, 1997.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. (Ed.). Funep. p. 154, 2003.

PEARCE, J. H et al. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids wich stimulates the grow of *B. abortus* in bovine phagocytes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 31-37, 1961.

PELLEGRIN, A.O. et al. Prevalência de brucelose bovina no Pantanal Matogrossense. Resumos, **26º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Campo Grande, 1999.

PIZARRO-CERDÁ, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmatic reticulum of non professional phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5711-5724, 1998.

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

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

PROBERT, W. S. et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1290-1293, 2004.

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

REDMAN, D. R.; DEYOE, B. L.; KING, N. B. Resistance of cattle to *Brucella abortus* following vaccination at two and three months of age. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 150, p. 403-407, 1967.

REIS, R. Brucelose: O que é, suas causas e seus problemas. Curitiba: UFMG. 1977.

RIBEIRO, M. G. et al. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 137-150, 1997.

RUST, R. Brucellosis [Online]. 2010 Jan 11. Available from: URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1164632-overview>

SAMARTINO, L. E; ENRIGHT, F. M. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology Microbiology e Infections Diseases**, v. 16, p. 95-101,

1993.

SANTOS, R.L. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 83-98, 2005.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p.801-808, 2010.

SILVA, F.F.; ÍTAVO, L.C.V. Consumo, desempenho, característica de carcaça e biometria do trato gastrointestinal e dos órgãos internos dos novilhos nelores recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado e proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1654-1670, 2002.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of *Brucella*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, p. 209-229, 1990.

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

THOMPSON, D. et al. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. **Science e Thecnology Reviews**, v. 21, p. 675-687, 2002.

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

WALKER, R. L. *Brucella*. In: HIRSH, D. C.; EE, Y. C. (Ed.) *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003.

WERLING, D.; JUNGI, W. TOLL-like receptors linking innate and adaptavive immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR ANTE MORTEM DE *Brucella* spp. EM BOVINOS

Anna Letícia Rigo Munhoz¹, Cleber Oliveira Soares^{1,2}, Renata Bastos¹, Marrielen Aparecida Benites Caetano¹, Mônica da Silva Custódio¹, Grácia Maria Soares Rosinha^{1,2/+}

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil ²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

As bactérias do gênero *Brucella* são os agentes etiológicos da brucelose, uma das doenças infecciosas que causa grandes perdas econômicas a cadeia produtiva da carne e do leite, devido os prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos nos animais. A PCR atualmente é uma técnica molecular que tem sido desenvolvida para o diagnóstico rápido dessa zoonose. Quando utilizado na reação de amplificação o par de oligonucleotídeos BCPS31, BruAb_0168, Ery 1 e Ery 2 detecta-se respectivamente a presença de *Brucella* spp, *B. abortus* e a amostra vacinal B19. Em 257 amostras de sangue de bovinos pertencentes à região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul identificou-se a presença de anticorpos anti- *Brucella* spp. em 66 amostras testadas no AAT e 22 amostras na PCR com o oligonucleotídeo BCPS31, *B. abortus* foi identificada em (235/257), e a amostra vacinal B19 (145/257). Os resultados obtidos neste estudo indicam que a técnica de PCR pode ser utilizada como um diagnóstico *ante mortem* para identificar *Brucella* spp. em sangue de bovinos e, diferenciá-las em amostra de campo ou vacinal B19.

Palavras - chave: *Brucella abortus*, vacina B19, PCR

A brucelose é uma importante zoonose bacteriana que se encontra disseminada em muitos países, sendo o seu agente etiológico constituído por cocobacilos gram-negativos pertencentes ao género *Brucella* (Young 1995). O género contém dez espécies que são reconhecidas e classificadas com base principalmente em seus hospedeiros preferenciais e patogenicidade (Godfroid 2005; Perkins et al. 2010).

A manifestação clínica mais comum da brucelose animal é a perda reprodutiva resultante de aborto, nascimento de filhotes fracos ou infertilidade (Seleem et al. 2010). Essa enfermidade gera graves impactos económicos sobre a rentabilidade dos rebanhos em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, além de representar um problema de saúde pública (Godfroid et al. 2005; Pappas et al. 2006).

Devido ao enorme custo da brucelose para a indústria pecuária, bem como seu efeito sobre a saúde pública, diversos países vem adotando programas de controle e erradicação desta doença (Olsen & Stoffregen 2005). No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) fundamenta-se em dois focos principais com relação à brucelose bovina: o diagnóstico, baseado até o momento em técnicas sorológicas e a vacinação (Brasil 2006).

Atualmente, avanço nas técnicas de biologia molecular tem fornecido novas ferramentas para o diagnóstico rápido de diversas enfermidades. Numerosos ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para detecção rápida e confirmação de *Brucella* spp. (Gemechu et al. 2011).

A amplificação de ácidos nucleicos utilizando os pares de oligonucleotídeos BCPS31 que codifica uma proteína imunogênica com 31kDa conservada em *Brucella*

spp. (Baily et al. 1992) e BruAb_0168 referente a uma sequência específica para *B. abortus* (Halling et al. 2005) são utilizados como forma de diagnóstico molecular para a brucelose detectando *Brucella* spp. e diferenciando em *B. abortus*, respectivamente.

Quanto à vacinação, a amostra viva atenuada B19 de *B. abortus* é essencial para os programas de controle da brucelose bovina, sendo esta a mais amplamente utilizada em diversas partes do mundo. Porém, esta vacina apresenta desvantagens claras: é patogênica para humanos; pode causar aborto quando administradas a fêmeas prenhas e também induz a produção de anticorpos que interferem no teste de diagnóstico de populações infectadas a campo, dificultando uma avaliação objetiva das circunstâncias epidemiológicas (Cheville et al.1993).

O gene *ery* tem sido descrito na literatura como um importante marcador na diferenciação da vacina B19 de amostras de campo de *Brucella* spp. A identificação da amostra vacinal B19 está baseada na deleção parcial de 702 pares de base (pb) no gene ligado ao catabolismo do eritritol (*ery*) (Ewalt & Bricker 2000).

O contato entre bovinos e animais silvestres é muito observado no Pantanal, onde os mesmos convivem regularmente num sistema de criação extensiva (Lacerda 2008). Este estreito contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, estabelecendo-se assim novas relações na cadeia de transmissão das doenças (Corrêa & Passos 2001).

Assim, o objetivo neste estudo foi avaliar a técnica de PCR como um diagnóstico *ante mortem* para identificar *Brucella* spp. em sangue de bovinos pertencentes à região da Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul, e, diferenciá-las em amostra de campo ou vacinal B19.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras- Foram coletadas 257 amostras de sangue total e soros de bovinos não vacinados na fase adulta pertencentes à região da Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul. As amostras foram obtidas por meio de punção da veia jugular com tubos Vacutainer® com e sem etilenodiaminotetra cético (EDTA), e conservadas a -20 °C.

Diagnóstico sorológico- Os soros dos bovinos foram examinados quanto à presença de anticorpos para a brucelose. Foi realizado o teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) conforme a recomendação do PNCEBT (Brasil 2006). A identificação da reação foi observada pela presença ou ausência de aglutinação.

Extração de DNA- A extração de DNA do sangue dos animais foi realizado de acordo com Araújo et al. (2009) no Laboratório de Engenharia Genética da Embrapa Gado de Corte, obtendo a concentração final de 50 ng/μl, após quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000). A qualidade das amostras de DNA foi observada pela eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 0,8%, posteriormente corado com SYBR GOLD (Invitrogen®), analisado sob luz ultravioleta em transiluminador (Transluminator Loccus Biotecnologia).

Amplificação dos genes pela PCR- As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 μl. Cada reação contendo 2 μl de tampão PCR 10x (1x); 0,6 μl de MgCl₂ (0,03 mM); 0,6 μl de dNTP (0,3 mM); 1 μl de cada oligonucleotídeo (0,25 pMol); 0,3 μl de *Taq*DNA-polimerase (2,5 UI); 2 μl do DNA a ser testado (50ng/μl) e H₂O (*Mili-Q*®) em quantidade suficiente para completar o volume total da reação.

As reações de amplificação foram feitas no aparelho termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradient[®]), utilizando-se os DNAs extraídos das amostras de sangue e das amostras padrão *B. suis* biovar 1, *B. abortus* 544, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* biovar 1, *B. ovis*, *B. abortus* vacinal B19, amostra padrão USDA B19 e amostra virulenta S2308 que foi utilizada como controle positivo na PCR com os oligonucleotídeos BCPS31, BruAb_0168 e Ery 1 e Ery 2, enquanto a amostra vacinal B19 foi utilizada como controle positivo somente na PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2.

Iniciadores- Utilizou-se o par de oligonucleotídeos gênero-específico para *Brucella* spp. BCPS31F e BCPS31R descrito por Baily et al (1992) que amplificam fragmentos de 233pb referente ao gene que codifica uma proteína imunogênica de 31 kDa. O ciclo de temperatura empregado procedeu-se da desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/60 segundos, anelamento a 55°C/60 segundos e extensão a 72°C/45 segundos e uma extensão final a 72°C/10 minutos (Miyashiro et al. 2007).

Já o par de oligonucleotídeos BruAb_0168F e BruAb_0168R, amplificam fragmentos de 81pb referente a uma sequência específica para *B. abortus* descrito por Hinić et al (2008). A reação de amplificação teve início com a desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C/30 segundos, anelamento a 60°C/30 segundos e extensão a 72°C/20.

Para a detecção da amostra vacinal B19 foi utilizado o par de oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2 descritos por Sangari et al. (2000), que amplificaram fragmentos de 361pb referente à deleção de 702pb no gene *ery* e a amplificação de 1063pb referentes às amostras de campo de *B.abortus*. O ciclo de temperatura empregado procedeu-se da desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a

94°C/60 segundos, anelamento a 68°C/120 segundos e extensão a 72°C/120 segundos e uma extensão final a 72°C/10 minutos (Miyashiro et al. 2007).

A análise dos produtos amplificados com o par de oligonucleotídeos BCPS31 e Ery 1 e Ery 2 foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e do BruAb_0168 por eletroforese em gel de agarose 3%, ambos corados com SYBR GOLD (Invitrogen®), analisado sob luz ultravioleta em transiluminador (Transluminator Loccus Biotecnologia).

Análise estatística - Para testar a discordância dos testes diagnósticos em cada grupo foi calculado o teste de McNemar ($p < 0,01$). Para a execução da estatística foi utilizado o programa BioEstat®.

RESULTADOS

Das 257 amostras testadas, 66 apresentaram soroaglutinação positiva para o AAT (tabela 2).

Quando testadas pela técnica de PCR com o par de oligonucleotídeos BCPS31, do total de 257 amostras, 22 amostras amplificaram o fragmento de 223pb, mostrando que as mesmas são pertencentes ao gênero *Brucella* (figura 1) e as 257 amostras quando testadas com o par de oligonucleotídeos BruAb_0168, 235 amostras amplificaram o fragmento de 81pb, referentes à espécie *B. abortus* (figura 2).

Nas amostras padrão quando testadas para a amplificação do gene *ery*, em *B. suis* biovar 1, *B. abortus* 544, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* biovar 1, *B. ovis* e amostra de campo 2308 foi possível constatar a amplificação do fragmento de 1063pb referentes ao gene *ery* intacto, diferindo do observado nas amostras *B. abortus* B19, e a amostra padrão USDA B19, que amplificaram fragmentos de 361pb (figura 3).

A característica da deleção de 702 pb referente ao gene *ery* foi encontrada em 145 do total das amostras testadas, onde foi possível observar o fragmento de 361pb amplificado pelos oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2, diferente de 3 amostras que apresentaram fragmentos de 1063pb, e a amostra de campo S2308 que foi utilizada como controle (figura 4).

A estatística utilizando o teste de McNemar foi significativa ($p < 0,001$). em todas as relações dos testes de diagnóstico demonstrando que há diferença entre o teste sorológico e os moleculares e entre os testes moleculares.

Os resultados da interação dos testes de diagnóstico analisados pela estatística do teste de McNemar estão presentes nas tabelas de III a VIII (apêndice).

DISCUSSÃO

Em relação análise estatística entre o teste sorológico AAT com os testes moleculares, houve uma diferença significativa quando comparado com o oligonucleotídeo BCPS31, no qual o teste AAT identificou a presença de uma quantidade maior de animais positivos.

O DNA genômico utilizado neste estudo foi extraído de amostras de sangue total, possivelmente a pequena quantidade de bactérias presente no sangue, pode resultar na ausência do DNA alvo (*Brucella* spp.), conduzindo para resultados falsos negativos (Al Dahouk & Nöckler 2011), sendo vantajoso confirmar o diagnóstico molecular do oligonucleotídeo BCPS31, usando outros marcadores moleculares para aumentar a sensibilidade e especificidade diminuindo a presença de falsos negativos (Al Dahouk et al. 2007).

Os oligonucleotídeos BruAb_0168 e Ery 1 e Ery 2 se diferiram do oligonucleotídeo BCPS31 quando comparados com o teste sorológico. Mesmo com uma possível baixa bacteremia, os oligonucleotídeos BruAb_0168 e Ery 1 e Ery 2 identificaram uma quantidade maior de animais positivos.

Foi observada uma diferença significativa entre os testes moleculares, o oligonucleotídeo BruA_0168 apresentou maior quantidade de animais positivos quando comparado com o oligonucleotídeo BCPS31. A diferença encontrada entre os oligonucleotídeos BCPS31 e BruAb_0168 utilizados na PCR, pode ser possivelmente explicada relacionando o tamanho do fragmento amplificado por cada um, 223pb e 81pb respectivamente. Em um estudo para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue bovino, o oligonucleotídeo BCPS31 identificou uma grande quantidade de animais positivos (Mukherjee et al. 2007) o que não foi possível identificar neste estudo.

O par de oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2 identificou uma maior quantidade de animais positivos, sendo estes pertencentes a amostra vacinal B19 e 3 amostras de campo que amplificaram o fragmento de 1063pb para *Brucella* spp. quando comparado com o oligonucleotídeo BruAb_0168 referente a espécie de *B. abortus*.

As bactérias do gênero *Brucella* exigem um reservatório animal para sua manutenção. A preferência pelo hospedeiro é demonstrada pelas diferentes espécies de *Brucella*, sendo os bovinos os hospedeiros preferenciais para *B. abortus* (Hirsh et al. 2003). A presença de *B. abortus* e da amostra vacinal B19 nos animais não vacinados pode ser possivelmente explicada por alguns fatores de transmissão, como a sua manutenção e disseminação entre e dentro dos rebanhos, por meio da aquisição de animais contaminados, proximidade de rebanhos infectados que compartilham pastos, muitas vezes divididos por uma simples cerca e o contato direto e indireto com a

bactéria eliminada durante o aborto ou parto aliado a sua capacidade de sobrevivência ambiental (Crowford et al. 1990).

Os animais deste estudo compartilhavam da pastagem nativa utilizada por outros animais silvestres, principalmente os ungulados silvestres. O Pantanal é um habitat que tende a enfrentar grandes modificações ocorridas na paisagem local, pois este bioma é considerado uma grande planície inundável. O mosaico de habitats inundáveis e não inundáveis faz do Pantanal um refúgio, não só para espécies silvestres (Mourão et al. 2002), mas também para os animais domésticos que circulam nesse ambiente. A convivência entre animais domésticos em simpatria com animais silvestres no Pantanal do Mato Grosso do Sul representa um fator de risco na cadeia epidemiológica da brucelose.

Em relação ao diagnóstico *ante-mortem*, a utilização de testes moleculares pode ser uma prática eficiente na detecção de *Brucella* spp., permitindo a diferenciação em espécie e amostra vacinal, além de ser mais rápida e apresentar menos risco biológico quando comparada com o isolamento.

Os resultados do presente trabalho indicam que a técnica de PCR pode ser utilizada como um diagnóstico *ante mortem* para identificar *Brucella* spp. em sangue de bovinos e, diferenciá-las em amostra de campo ou vacinal B19.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) por meio do Macroprograma 3 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq por meio do Edital CNPq/MAPA/SDA N° 64/2008.

REFERÊNCIAS

- Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Pfeffer M, Neubauer H, Tomaso H 2007. Evaluation of genes- specific and species-specific real time PCR assay for the identification of *Brucella* spp. *Clin Chem Lab Med* 45(11):1464-1470.
- Al Dahouk S, Nöckler K 2011. Implification of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect* 9: 833-845.
- Araújo FR, Ramos CAdoN, Luíz HL, Peres IAHS, Oliveira RHMde, Souza IIFde, Russi LdosS 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir do sangue total. *Comunicado técnico: Embrapa Gado de Corte* 120:5.
- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95: 271-275.
- Brasil. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT 2006. *Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento*, Brasília, 192pp.
- Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S 2000. Molecular characterization of *Brucella* trains isolated from marine mammals. *J of Clin Microbiol* 38: 1258–1262.
- Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. *A J of Vet Res* 54: 1591-1597.
- Côrrea SHR, Passos EC 2001. Wild animals and public health. *Biology, medicin and surgery of South American willd animals* 493-499.
- Crawford RP, Huber JD, Adams BS 1990. Epidemioly and surveillance. In: *Animal brucellosis* 131-151.
- Gemechu MY, Gill JP, Arora AK, Ghatak S, Singh DK 2011. Polymerase chain reacion (PCR) assay for rapid diagnosis and its role in prevention of human brucellosis in Punjab, India. *J Prev Med* 2:170-777.

- Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res Com* 36: 313-326.
- Halling SM, Peterson-Bruch BD, Bricker BS, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DB, Olsen SC 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J of Bacteriol* 8:2715-2726.
- Hinić V, Brodard I, Thomann A, Cvetnić Ž, Makaya PV, Frey J, Abril C 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol Methods* 75: 375–378.
- Lacerda ACR 2006. Ecologia e estrutura social do veado- campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal. *Tese de doutorado UNB* 194p
- Miyashiro S, Scarelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME 2007. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Braz J of Microbiol* 38: 17-22
- Mourão GM, Coutinho ME, Mauro RA, Tomás WM, Magnusson W 2002. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; Embrapa Pantanal*.
- Mukherjee F, Jain J, Patel V, Nair M 2007. Multiple genes-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *J of Medical Microbiol* 56:1309-1316.
- Olsen SC, Stoffregen WS 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev of Vaccines* 4: 915–928.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos VE 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6: 91–99.
- Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS 2010. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEM Microbiol Rev* 34:379–394.
- Sangari FJ, Agüero J, Gacía-Lobo JM 2000 The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiol* 146: 487-495.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 140: 392–398.
- Young EJ 1995. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21: 283–289.

Tabela I

Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional para *Brucella* spp.

Oligonucleotídeos	Sequência	Pares de base	Gene	Autor
BCPS31F	5' TGGCTCGGTTGCCAATATCAA3'	223	<i>bcps31</i>	Baily et al. 1992
BCPS31R	5' CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG3'			
BruAb_0168F	5' GCACACTCACCTTCCACAACAA3'	81	<i>bruab_0168</i>	Hinic et al. 2008
BruAb_0168R	5' CCCCGTTCTGCACCAGACT3'			
Ery 1	5' TTGGCGGCAAGTCCGTCCGGT3'	361 ou 1063	<i>ery</i>	Sangari et al. 2000
Ery 2	5' CCCAGAAGCGAGACGAAACG3'			

Tabela II

Resultado dos testes sorológico (AAT) e molecular por meio da técnica de PCR convencional para *Brucella* spp. utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BCPS31, BruAb_0168 e Ery 1 e Ery 2 com DNA extraído de sangue de bovinos.

	Sorológico		Molecular	
	AAT	BCPS31	BruAb_0168	Ery 1-2
Negativos	191	235	22	109
<i>Brucella</i> spp.	66	22	-	3
<i>B. abortus</i>	-	-	235	-
B19	-	-	-	145

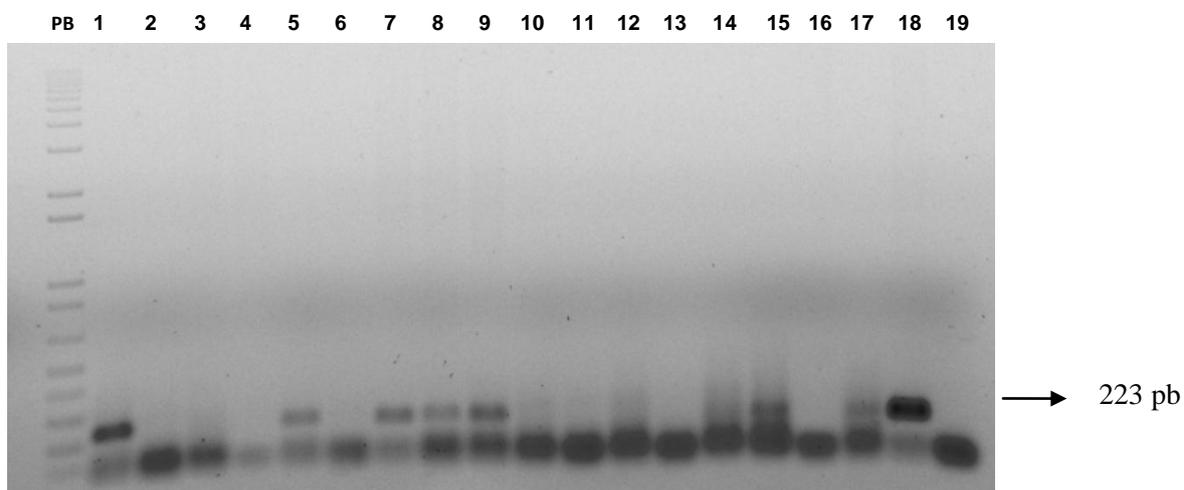


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR com o par de oligonucleotídeos BCPS31F/BCPS31R, de DNA extraído do sangue de bovinos. (PB) Padrão de pares de base 1 Kb DNA Plus Invitrogen®; (1-17) Amostras de sangue; (18) *B. abortus* S2308; (19) Controle negativo.

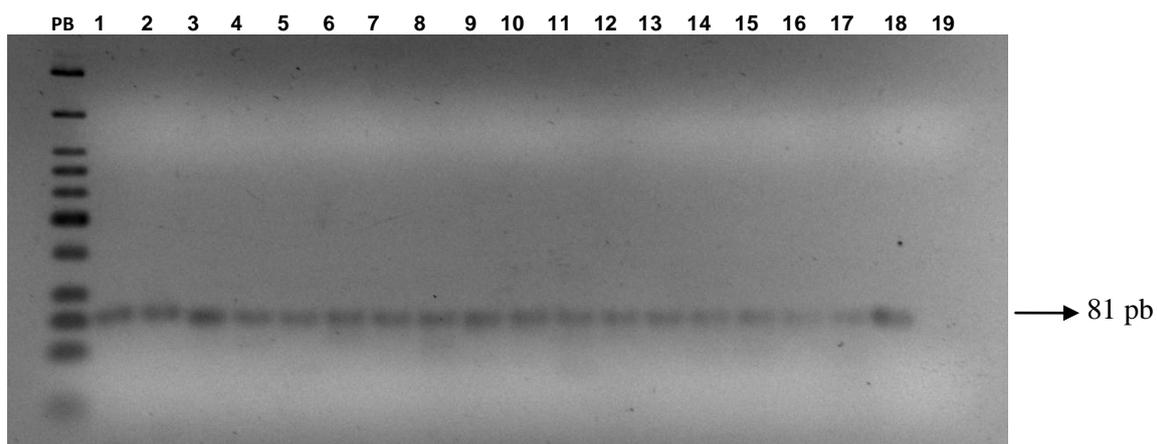


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 3% da PCR com o par de oligonucleotídeos BruAb_0168F/BruAb_0168R, de DNA extraído do sangue de bovinos. (PB) Padrão de pares de base Weight DNA LADDER; (1-17) Amostras de sangue; (18) *B. abortus* 2308; (19) Controle negativo.

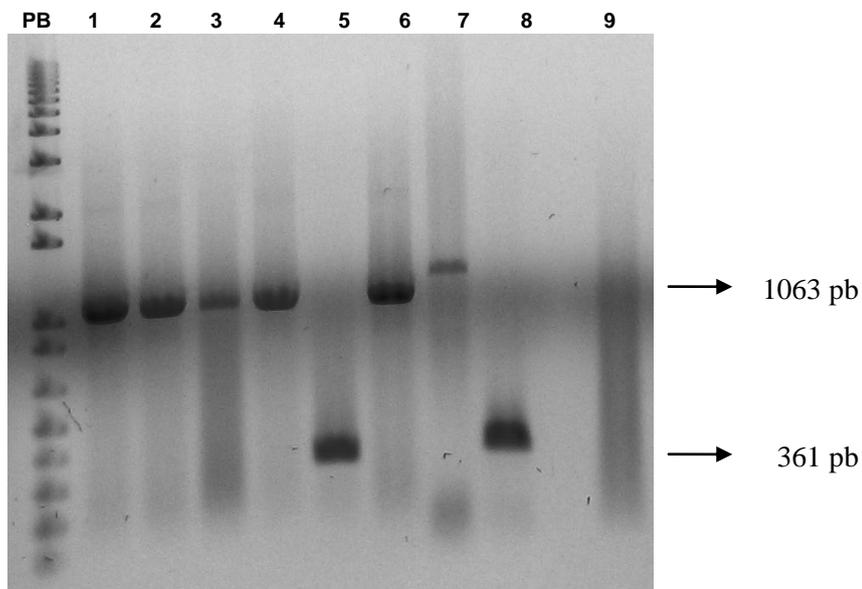


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR com o par de oligonucleotídeos Ery1/Ery2, das amostras de DNA padrão. (PB) Padrão de pares de base 1 Kb DNA Plus Invitrogen®; (1) *B. suis* biovar 1; (2) *B. abortus* 544; (3) *B. abortus* RB51; (4) *B. melitensis* biovar 1; (5) *B. abortus* B19; (6) *B. ovis*; (7) *B. abortus* 2308; (8) Amostra vacinal B19; (9) Controle negativo.

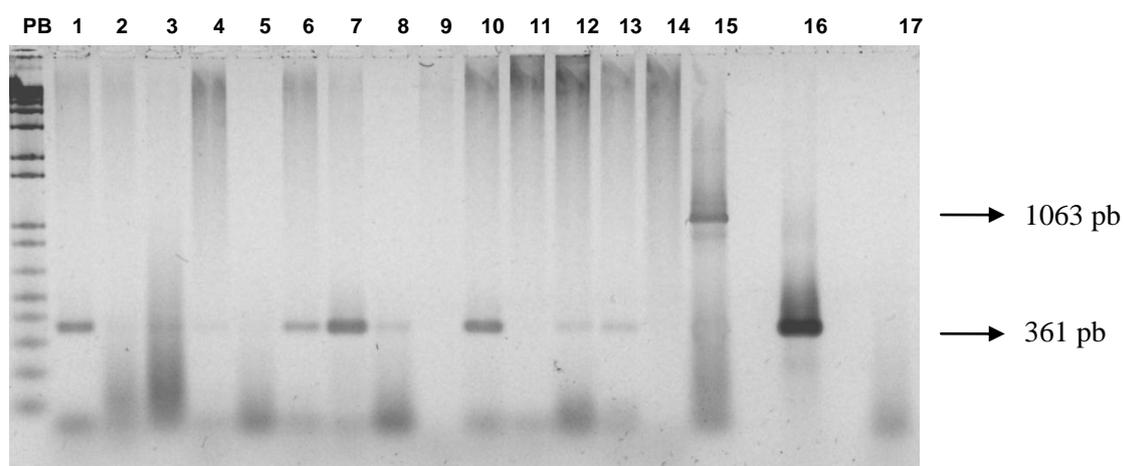


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da PCR com o par de oligonucleotídeos Ery1/ Ery2, de DNA extraído do sangue de bovinos. (PB) Padrão de pares de base 1 Kb DNA Plus Invitrogen®; (1-14) Amostras de sangue; (15) *B. abortus* 2308; (16) Amostra vacinal B19; (17) Controle negativo.

APÉNDICE

Tabela III

Resultado comparativo do teste sorológico AAT com o teste molecular utilizando o oligonucleotídeo BCPS31.

BSCP31				
		POS	NEG	TOTAL
AAT	POS	16	50	66
	NEG	6	185	191
TOTAL		22	235	257

P<0,001

Tabela IV

Resultado comparativo do teste sorológico AAT com o teste molecular utilizando o oligonucleotídeo BruAb_0168.

BruAb_0168				
		POS	NEG	TOTAL
AAT	POS	46	20	66
	NEG	189	2	191
TOTAL		235	22	257

P<0,001

Tabela V

Resultado comparativo do teste sorológico AAT com o teste molecular utilizando o par de oligonucleotídeos Ery 1 e Ery 2.

Ery1/Ery2				
		POS	NEG	TOTAL
AAT	POS	55	11	66
	NEG	93	98	191
TOTAL		148	109	257

P<0,001

Tabela VI

Resultado comparativo entre os testes moleculares utilizando os oligonucleotídeos BCPS31 e BruAb_0168.

		BruAb_0168		
		POS	NEG	TOTAL
BSCP31	POS	19	3	22
	NEG	216	19	235
TOTAL		235	22	257

P<0,001

Tabela VII

Resultado comparativo entre os testes moleculares utilizando os oligonucleotídeos BCPS31 e Ery 1-2.

		Ery1/Ery2		
		POS	NEG	TOTAL
BSCP31	POS	2	20	22
	NEG	246	89	235
TOTAL		148	109	257

P<0,001

Tabela VIII

Resultado comparativo entre os testes moleculares utilizando os oligonucleotídeos BruAb_0168 e Ery 1-2.

		ery1/ery2		
		POS	NEG	TOTAL
BruAb_0168	POS	139	96	235
	NEG	9	13	22
TOTAL		148	109	257

P<0,001

