

Identificação de *Brucella* spp. em bovinos com lesões sugestivas de brucelose



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
43**

Identificação de *Brucella* spp. em bovinos
com lesões sugestivas de brucelose

*Grácia Maria Soares Rosinha
Lenita Ramires dos Santos
Irene Elisei
Cristiane C. Sanches
Marrielen A. B. C. Bertolacci
Cynthia Mantovani
Carina Elisei
Cleber Oliveira Soares*

**Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Cortel

Presidente
Thais Basso Amaral

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, André
Dominghetti Ferreira, Andréa Alves do Egito,
Kadjah Suleiman Jaghub, Liana Jank, Lucimara
Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de
Mendonça Vilela, Rodiney de Arruda Mauro,
Wilson Werner Koller

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Renata Cunha Madureira

1ª edição
1ª impressão (2019): eletrônico

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Identificação de *Brucella* spp. em bovinos com lesões sugestivas de
brucelose / Grácia Maria Soares Rosinha ... [et al.]. - Campo Grande, MS :
Embrapa Gado de Corte, 2019.
PDF (30 p.) : il. color. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-9715 ; 43).

1. *Brucella abortus*. 2. Brucelose. 3. Cadeia produtiva. 4. Diagnóstico. 5.
DNA. 6. Pecuária. I. Rosinha, Grácia Maria Soares. II. Santos, Lenita Ramires
dos. III. Elisei, Irene. IV. Sanches, Cristiane C. V. Bertolacci, Marrielen A. B.
C. VI. Mantovani, Cynthia. VII. Elisei, Carina. VIII. Soares, Cleber Oliveira. IX.
Série.

CDD 579.33 (23. ed.)

Sumário

Introdução.....8

Material e métodos 11

Resultados15

Discussão23

Conclusão.....25

Agradecimentos.....25

Referências26

Identificação de *Brucella* spp. em bovinos com lesões sugestivas de brucelose

Grácia M. S. Rosinha¹

Lenita Ramires dos Santos²

Irene Elisei³

Cristiane C. Sanches⁴

Marrielen A. B. C. Bertolacci⁵

Cynthia Mantovani⁶

Carina Elisei⁷

Cleber Oliveira Soares⁸

Resumo – A prevalência de focos da brucelose bovina em propriedades pecuárias no Brasil varia de 0,32% a 41,5%. O Estado de Mato Grosso do Sul tem 41,5% de suas fazendas com pelo menos um animal reagente à prova sorológica. Estes índices por si só são muito expressivos e impactam nos diferentes segmentos das cadeias produtivas da pecuária de corte e de leite, além de implicar em barreira comercial à exportação da carne bovina. Assim, há necessidade de um teste rápido *post-mortem*, de altas sensibilidade e especificidade que possa ser usado como ferramenta de diagnóstico em sistemas de vigilância sanitária, frente à brucelose bovina. Diante disto, 20 bovinos de diferentes frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, que apresentavam lesões sugestivas para brucelose na hora do abate, foram submetidos à coleta de sangue e fragmentos de pulmão, fígado, músculo, linfonodos e ligamento cervical. Dos fragmentos foi realizada a cultura para isolamento

¹ Engenheira-Agrônoma, doutora em Bioquímica, Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

² Bióloga, doutora em Imunologia, Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

³ Médica-Veterinária, mestre em Ciência Animal

⁴ Médica-Veterinária, doutora em Ciência Animal

⁵ Bióloga, doutora em Biotecnologia e Biodiversidade

⁶ Bióloga, mestre em Bioquímica, aluna de doutorado do Curso de Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

⁷ Bióloga, doutora em Parasitologia, Professora na Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS

⁸ Médico-Veterinário, doutor em Parasitologia, Diretor de Inovação e Tecnologia da Embrapa, Brasília, DF

de *Brucella* spp. e, a identidade das colônias obtidas foram confirmadas por AMOS-PCR, para definição de gênero e espécie. Das amostras de sangue foram extraídos os DNA's para análise por PCR e qPCR com os primers BruAb_0168 (em nível de gênero e espécie). Das 20 amostras cultivadas foram isoladas colônias em 12 amostras (60%), sendo oito (40%) confirmadas pela AMOS-PCR. Destas 8 amostras obtiveram-se 9 isolados de *Brucella*, pois de um animal foram isoladas, concomitantemente, as cepas selvagem e vacinal. Destes nove isolados, sete foram identificados como *B. abortus* (biovar 1, 2 e 4) e dois como cepa vacinal B19. As técnicas de PCR e qPCR para amostras de DNA de sangue apresentaram positividade de 90% (18/20) e 95% (19/20) para *B. abortus*, respectivamente. Com isso, a PCR e qPCR mostraram-se mais eficientes que o isolamento em cultura, na detecção de animais positivos com lesões sugestivas de brucelose bovina, com potencial de serem utilizadas como métodos mais rápidos e eficientes.

Termos para indexação: *Brucella* spp., diagnóstico, isolamento, PCR, qPCR, DNA sangue.

Abstract – The prevalence of bovine brucellosis outbreaks in livestock properties in Brazil ranges from 0.32% to 41.5%. Mato Grosso do Sul State has 41.5% of its farms with at least one serological test reactive animal. Although apparently small, these indices themselves are very expressive and greatly impact the different segments of the beef and dairy livestock production chains, as well as implying a commercial barrier to beef exports. Thus, there is need a post-mortem rapid test of high sensitivity and specificity that can be used as a diagnostic tool in health surveillance systems against bovine brucellosis. Thus, 20 cattle from different slaughterhouses in the state of Mato Grosso do Sul, which presented lesions suggestive of brucellosis at the time of slaughter, were submitted to collection of blood and fragments of lung, liver, muscle, lymph nodes and cervical ligament. The fragments were cultured for isolation of *Brucella* spp. The colonies obtained were confirmed by AMOS-PCR to define genus and species. From the blood samples, DNA's were extracted for PCR and qPCR analysis with BruAb_0168 primers (at genus and species level). From the 20 cultivated samples, isolated colonies were

obtained from 12 samples (60%), 8 (40%) confirmed by AMOS-PCR. From these 8 samples, 9 *Brucella* isolates were obtained, since from one animal, wild and vaccinal strains were concomitantly isolated. Of these 9 isolates, seven were identified as *B. abortus* (biovar 1, 2 and 4) and two as vaccine strain S19. PCR and qPCR techniques for blood DNA samples showed 90% (18/20) and 95% (19/20) positivity for *B. abortus*, respectively. Thus, PCR and qPCR were more efficient than isolation in culture in detecting positive animals with lesions suggestive of bovine brucellosis, with potential to be used as faster and more efficient methods.

Index terms: *Brucella* spp., diagnosis, isolation, PCR, Real Time PCR, blood DNA.

Introdução

A pecuária de corte é a atividade que ocupa a maior área dentre todas as atividades agropecuárias desenvolvidas no Brasil, com cerca de 171,86 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2017). O Brasil figura atualmente como um dos principais atores na produção e comércio de carne bovina no mundo; reflexo de um estruturado processo de desenvolvimento que elevou não só a produtividade como também a qualidade do produto brasileiro e, conseqüentemente sua competitividade e abrangência de mercados (GOMES *et al.*, 2017).

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 de produtos de origem animal (SOLA, 2011), que além de colocar em risco a saúde do rebanho, podem representar um problema de saúde pública, como é o caso da brucelose.

A brucelose bovina é considerada uma antropozoonose de distribuição mundial, que provoca perdas econômicas ao sistema produtivo, além de ocasionar agravos à saúde da população (CASTRO *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2016). É caracterizada por um longo período de incubação, o que leva a uma doença crônica, potencialmente fatal em humanos, pois causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas (SELEEM *et al.*, 2010; ATLURI, *et al.*, 2011). A brucelose humana costuma se apresentar de forma severa e debilitante, além de exigir um tratamento prolongado com antibióticos e ainda assim resultar em sequelas irreversíveis. É uma enfermidade adquirida principalmente por meio do contato com animais infectados ou, mais frequentemente, pelo consumo de leite e seus derivados contaminados (ACHA e SZYFRES, 2003), ou ainda pela manipulação de materiais contaminados ou culturas de laboratório (AVILA-CALDERÓN *et al.*, 2013). Em animais domésticos *B. abortus* está associada à habilidade da bactéria de induzir abortos, mortalidade fetal e infertilidade no rebanho, pois acomete principalmente órgãos reprodutivos dos bovinos (CARVALHO-NETA *et al.*, 2010).

A prevalência de focos da brucelose bovina em propriedades pecuárias no Brasil varia de 0,32% a 41,5% (SANTOS et al., 2013). O Estado de Mato Grosso do Sul apresentou o maior índice (41,5%) de fazendas que apresentaram pelo menos um animal reagente à prova sorológica (CHATE et al., 2009). Estes índices são muito expressivos e muito impactam nos diferentes elos e segmentos das cadeias produtivas das pecuárias de corte e de leite, da porteira à mesa.

Estudos realizados em 2013 demonstraram que o prejuízo total da brucelose no Brasil foi estimado em aproximadamente U\$ 448 milhões de dólares americanos, que equivale, hoje, a cerca de R\$ 1 bilhão de reais. A cada 1% de variação na prevalência, estima-se um prejuízo de mais de U\$ 77,85 milhões de dólares ou R\$ 174,70 milhões de reais sobre o custo da brucelose bovina no Brasil. As perdas por fêmea infectada, com idade superior a 24 meses, foram estimadas em R\$ 473,50 e R\$ 255,20 em rebanhos de leite e de corte, respectivamente (SANTOS et al., 2013).

A brucelose bovina pode ser diagnosticada por diferentes métodos, isoladamente ou em conjunto. Os métodos de diagnósticos são divididos em diretos e indiretos; os diretos abrangem o isolamento e identificação do agente, imuno-histoquímica e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); já os indiretos são os que consistem na detecção de imunoglobulinas nos fluídos corporais (sorológicos), sendo os oficiais no Brasil, o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL) (para monitoramento de estabelecimentos certificados), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação do Complemento (FC), com os dois primeiros utilizados para triagem e os dois últimos como confirmatórios (BRASIL, 2006).

Sabe-se que os testes sorológicos podem apresentar falsos positivos devido a reações cruzadas com patógenos que apresentam antígenos similares aos de *Brucella* spp. (*Yersinia enterocolitica* 1509, *Escherichia coli* 0157 e 0116, *Bordetella bronchiseptica*, *Moraxela* sp.) (BARBOSA, 2009), bem como, por alta sensibilidade à B19 (MEGID et al., 2000) não conseguindo diferenciar animais vacinados de animais infectados, interferindo na detecção dos animais que estejam realmente doentes (SCHURIG; SPIRANGANATHAN; CORBEL, et al., 2002).

Por outro lado, o isolamento e a identificação da bactéria são considerados testes padrão, porém, esta metodologia requer tempo e representa

perigo para o executor se não forem observadas condições essenciais de biossegurança (REIS, 2015).

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). Segundo PAULIN e 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 biovares de *B. abortus* são necessárias elevadas concentrações de CO₂, 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 e 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 CO₂, presença de H₂S, tionina, fucsina básica, aglutinação em soro, tempo de atividade da uréase (ALTON *et al.*, 1975; CLOECKAERT e VIZCAINO, 2004).

Dentre os métodos diretos, têm-se destacado as técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variáveis, que apresentam-se como métodos rápidos e acurados que superam as limitações das metodologias tradicionais (MOHAMED *et al.*, 2013), além de possibilitar a diferenciação entre cepa selvagem e cepa vacinal (SANGARI *et al.*, 1994; BRICKER e HAILING, 1995). A PCR e suas va-

riantes têm sido desenvolvidas e aplicadas no diagnóstico de diferentes patógenos, inclusive *Brucella* spp. em diversos tipos de amostras tais como soro (GARSHASBI *et al.*, 2014; ZAMANIAN *et al.*, 2015), urina e leite (PACHECO *et al.*, 2012), sêmen (JUNQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2017); queijo (MIYASHIRO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2016; SOTO-VARELA *et al.*, 2018) e sangue (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A PCR-AMOS (A= *abortus*, M= *melitensis*, O= *ovis* e S= *suis*) é uma PCR-multiplex desenvolvida para a identificação e diferenciação de quatro espécies de *Brucella*: *B. abortus* (biovar 1, 2, e 4), *B. melitensis* (biovar 1, 2, e 3), *B. ovis* e *B. suis* (biovar 1) (BRICKER, 2002; BRICKER e HALLING, 1994), cepa selvagem 2308 e as cepas vacinais B19 e RB51 (BRICKER e HALLING, 1995).

A qPCR (PCR em Tempo Real), além de ser mais sensível e específica, tem a vantagem de identificar o DNA bacteriano em pequenas quantidades em amostras clínicas, em um curto período de tempo, quando comparado à PCR convencional (BOUNAADJA *et al.*, 2009).

Assim, objetivou-se neste estudo verificar a eficiência das técnicas de PCR e qPCR, utilizando o sangue de bovinos abatidos em frigorífico com lesões sugestivas de brucelose, comparando-as ao teste padrão de isolamento para o diagnóstico post-mortem de *Brucella* spp.

Material e métodos

Amostras biológicas – Foram utilizadas amostras de sangue (coletado da artéria braquiocefálica), pulmão, fígado, músculo, linfonodos e ligamento cervical de 20 bovinos, abatidos em frigorífico sob Inspeção Federal, que apresentavam lesões sugestivas de brucelose (Figura 1). Estes bovinos eram provenientes de diversas propriedades do Estado de Mato Grosso do Sul e, as amostras foram coletadas no período entre agosto de 2008 a abril de 2010.

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



Figura 1. Fotografia de uma lesão sugestiva de brucelose bovina localizada no ligamento cervical de bovino abatido em frigorífico sob inspeção federal em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (Fonte: Renata Cunha Madureira – Fiscal Federal – MAPA.)

Extração de DNA genômico de sangue – Foi realizada segundo a metodologia descrita por ARAÚJO *et al.*, (2009), com adaptações. Resumidamente, o protocolo foi iniciado com 300 μ L de sangue aos quais foram adicionados 500 μ L de SDS 20% e 2 μ L de proteinase K (20 mg/mL), seguida de uma incubação por 1 hora a 65°C. Após a incubação, foram adicionados 800 μ L de clorofórmio e 350 μ L de solução de precipitação proteica (acetato de potássio e ácido acético glacial); o homogeneizado foi centrifugado por 15 min a 13.000 rpm, o sobrenadante coletado e a precipitação do DNA ocorreu com a adição de 1 mL de etanol absoluto a 4°C. Para cada extração foi realizado um controle negativo comprovando a inexistência de contaminação. A mensuração da quantidade e da qualidade das amostras foi realizada no equipamento NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) com a leitura em um comprimento de onda de 260 λ . Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com Sybr Gold e visualizadas em transluminador sobre luz ultravioleta.

Processamento e cultivo microbiológico das amostras – As amostras clínicas foram identificadas e mantidas a -80°C no Laboratório de Engenharia Genética Animal da Embrapa Gado de Corte e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia Aplicada, no Departamento de Medicina

Veterinária Preventiva - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, onde foram processadas. As amostras foram retiradas do freezer 24 horas antes, e descongeladas lentamente em geladeira. Os tecidos foram colocados em bandejas estéreis e dissecados com auxílio de tesouras e pinças. Animais que continham mais de uma amostra coletada, foram realizados homogeneizados em “pool”, formando uma só amostra. Fragmentos de aproximadamente 1 cm³ foram colocados em placas de petri descartáveis. Em seguida, foram transferidos para sacos de homogeneização e acrescidos de cerca de 100 mL de PBS 1X estéril. Foram homogeneizados usando stomacher (Modelo MC 1204, ITR, Brasil) por 5 minutos com 400 golpes/minutos. A seguir, 100 mL destes foram semeados em meio de cultura seletivo sólido, Trypticase Soy Agar (TSA) e líquido, *Trypticase Soy Broth* (TSB) (ALTON *et al.*, 1988; OIE, 2004). Os materiais utilizados como meio de cultura foram suplementados com antimicrobianos de Farrell (*Brucella Selective Supplement SR0083A*, Oxid, UK) (FARRELL, 1974) e anfotericina B 0,1 mg/mL. As placas (TSA) e tubos (TSB) foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 7 dias. Em seguida, 1 mL do homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100 mL de Tris-EDTA (TE). As amostras foram inativadas em banho-maria a 85°C por 2 horas. Após a inativação, este material foi armazenado para posterior extração de DNA genômico.

Obtenção das colônias de *Brucella* spp. – A cada 48 horas, durante sete dias, as placas foram visualizadas para verificar se houve crescimento de colônias bacterianas. Casos em que não houve crescimento bacteriano, novas placas contendo meio TSA foram inoculadas com 200 mL do caldo TSB e mantidas em condições de cultivo durante 7 dias. Novamente foram observadas pelo mesmo período para a verificação de crescimento de colônias. As colônias isoladas de *Brucella* spp. foram armazenadas em meio de congelamento em criotubos e estocadas em freezer a -80 °C. A outra parte foi transferida para tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de PBS 1X. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 100 mL de TE e, posteriormente as amostras foram inativadas em banho-maria a 85°C por 2 horas para posterior extração de DNA, conforme descrito por Picher *et al.* (1989).

PCR – As reações de PCR com os DNAs de sangue e das colônias isoladas foram realizadas utilizando-se os primers descritos na Tabela 1.

Resumidamente, para os DNA's extraídos de sangue foram utilizados os primers BruAb_0168 para caracterização em nível de gênero e espécie. A técnica PCR-AMOS foi realizada com o DNA das colônias isoladas em meio TSA. Todas as reações e termociclagem foram realizadas seguindo os mesmos padrões dos autores descritos para cada primer apresentado na Tabela 1. As análises dos produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1% (AMOS) e 3% (BruAb_0168), corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador ultravioleta.

Tabela 1. Descrição dos *primers* utilizados na PCR e qPCR para a identificação de *Brucella* spp.

Primers	Patógeno	Sequência 5'-3'	Pares de Bases	Referência
BHBa ^{a,d}	<i>B. abortus</i>	GACGAACGGAATTTT- TCCAATCCC	498	BRICKER e HALLING, 1994
BHBm ^{a,d}	<i>B. melitensis</i>	AAATCGCGTCCTTGC- TGGTCTGA	731	
BHBo ^{a,d}	<i>B. ovis</i>	CGGGTTCTGGCACCA- TCGTCG	976	
BHBs ^{a,d}	<i>B. suis</i>	GCGCGGTTTTCTGAA- GGTTCAGG	285	
BHIS711 ^{a,b,d}	<i>Brucella</i> spp	TGCCGATCACTTAA- GGGCCTTCAT	-	
<i>ery</i> ^{a,d}	<i>B. abortus</i> B19	GCGCCGCGAAGAACT- TATCAA CGCCATGTTAGCG- CGGGTGA	178	BRICKER e HALLING, 1994
RB51/2308 ^{a,d}	RB51/2308	CCCCGCAAGATATGCT- TCGATCC	364	
BruAb_0168 ^c	<i>B. abortus</i>	GCACACTCACCTTCCA- CAACAA CCCCGTTCTGCACCA- GACT	81	HINIC et al., 2008

^aPrimers utilizados na PCR-AMOS; ^bPrimer utilizado como reverso para os outros primers na PCR-AMOS;

^cPrimers utilizados na PCR e qPCR; ^dPrimers utilizados na PCR.

qPCR – Esta técnica foi utilizada para as amostras de DNA de sangue. As reações foram realizadas em duplicata em um volume final de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de Platinum® SYBR® Green/Rox 2x (Invitrogen, EUA), 5

pmoL de cada primer e aproximadamente 50 ng de DNA genômico extraído de sangue. A termociclagem foi realizada em termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems*) de acordo com Hinic *et al.* (2008). Para a avaliação e quantificação das amostras foi construída uma curva padrão a partir de DNA extraído de cultura em meio TSA da cepa de referência selvagem 2308 de *B. abortus*. A amostra de DNA foi extraída e quantificada por espectrofotometria em Nanodrop (*ND1000 Thermo Scientific*) e o número de cópias de DNA por μL foi determinado conforme descrito por Lee *et al.* (2006), utilizando-se a fórmula:

$$\frac{6 \times 10^9 \text{ (cópias/mol)} \times \text{concentração (g/}\mu\text{L)}}{\text{Massa molar (g/mol)}} = \text{(cópias/}\mu\text{L)}$$

A partir da cepa de referência foram realizadas diluições seriadas em concentrações variando de 1×10^6 à 1×10^1 cópias de DNA/ μL . Todas as reações foram realizadas em duplicata. Como controle positivo nas reações, utilizou-se DNA da cepa de referência virulenta 2308 de *B. abortus*. Como controle interno da reação, utilizou-se água livre de nucleases. Para a confirmação da especificidade da reação, quatro animais provenientes de uma propriedade certificada pelo MAPA/Brasil como livre de Brucelose e Tuberculose foram utilizados como controle negativo e avaliados por qPCR.

Análises estatísticas – Os dados foram analisados pelo software Graphpad. O grau de concordância entre os métodos utilizados foi realizado pelo teste Kappa onde, baseado no índice kappa, pode-se averiguar quando havia pouca concordância ou concordância substancial (LANDIS e KOCH, 1977). O teste binomial foi aplicado para avaliar a significância estatística de cada teste diagnóstico, sendo considerado como significativo $P < 0,05$.

Resultados

Das 20 amostras cultivadas em meio TSA houve um crescimento de colônias isoladas em 60% destas (12/20). Quando analisado o DNA destas colônias pela técnica de AMOS-PCR, 40% (8/20) apresentaram-se positivas. Destas 8 amostras obteve-se 9 isolados de *Brucella*, pois de um animal (amostra 20) foram isoladas, concomitantemente, cepa selvagem e vacinal.

Destes 9 isolados, sete foram identificados como *B. abortus* (biovars 1, 2 e 4) amplificando dois fragmentos (498 pb referente a *B. abortus* e 178 pb, que corresponde ao gene *ery*) e dois como cepa vacinal B19, amplificando apenas um fragmento de 498 pb. Colônias da amostra 17 foram negativas para *Brucella* (Figura 2).

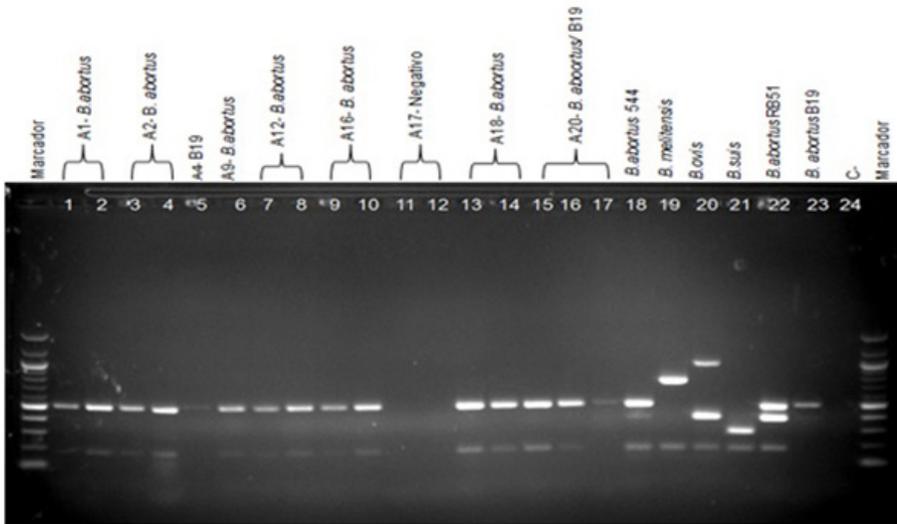


Figura 2. PCR-AMOS de colônias isoladas de bovinos de frigoríficos de MS, com lesões sugestivas de brucelose. As amostras 1 (canaletas 1 e 2), 2 (canaletas 3 e 4), 9 (canaleta 6), 12 (canaletas 7 e 8), 16 (canaletas 9 e 10), 18 (canaletas 13 e 14), e a amostra 20 (canaletas 15 e 16) apresentaram uma banda de 498 pb e uma de 178 pb referente a animais positivos para *B. abortus* biovars 1, 2 e 4; na amostra 4 (canaleta 5) houve a amplificação de um produto de 498 pb referente a cepa vacinal B19; a amostra 20 também apresentou amplificação referente a cepa vacinal B19 (canaleta 17); a amostra 17 (canaletas 11 e 12) refere-se a animal negativo. Os controles positivos utilizados foram *B. abortus* 544 (canaleta 18), *B. melitensis* M16 (canaleta 19), *B. ovis* Reo 198 (canaleta 20), *B. suis* (canaleta 21), *B. abortus* vacinal RB51 (canaleta 22), *B. abortus* B19 (canaleta 23). Na canaleta 24 está o controle negativo da reação. As canaletas marcador corresponde ao 100 pb DNA Ladder da DNALand Scientific.

As análises de PCR realizadas com os DNA's extraídos de sangue dos 20 bovinos apresentaram positividade de 90% (18/20) com os primers BruAb_0168 (Figura 3).

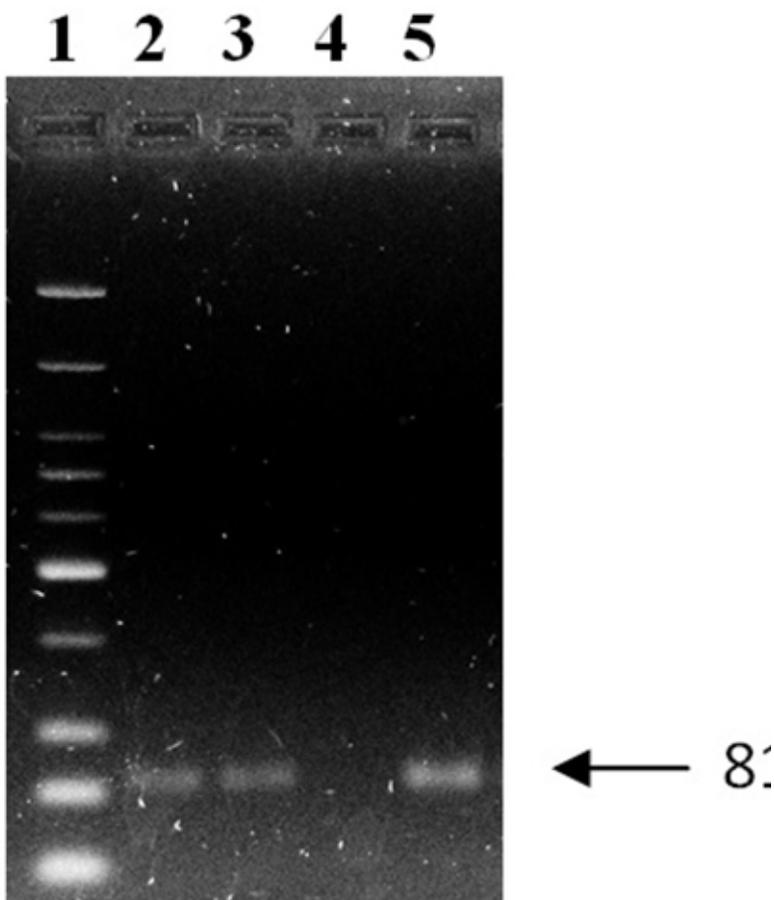
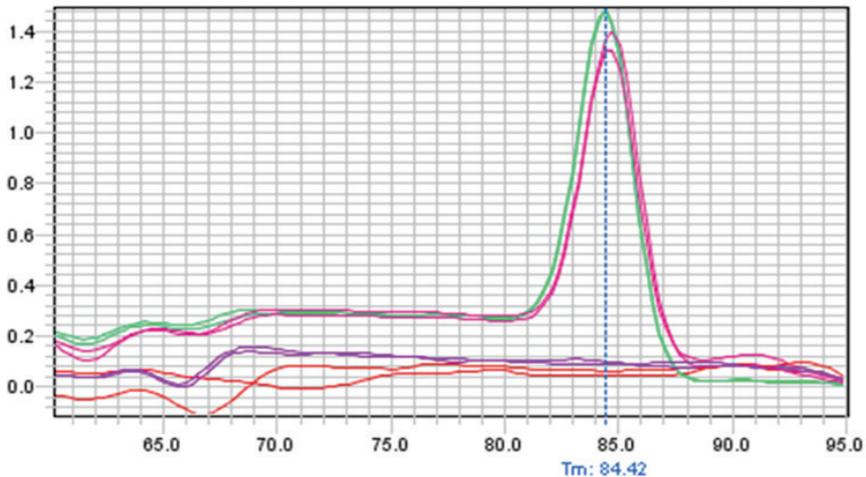


Figura 3. PCR de DNA de sangue de dois bovinos abatidos em frigoríficos com lesões sugestivas de brucelose, utilizando-se os *primers* BruAb_0168. Canaletas 1= marcador molecular *low molecular weight DNA ladder* (25pb-766pb); 2 e 3= animais positivos; 4= controle negativo da PCR e 5= controle positivo, DNA de *B. abortus* S2308.

As mesmas amostras de DNA de sangue foram utilizadas nas reações de qPCR com os *primers* BruAb_0168. As amplificações resultaram em fragmentos de DNA com temperatura média de dissociação (T_m) de 84,42°C e mostrou-se sensível detectando 95% (19/20) de animais positivos, e apenas um animal negativo (Figura 4).

Curva de Dissociação



■ Controle negativo ■ Controle positivo ■ Animal positivo ■ Animal negativo

Figura 4. Padrão da curva de dissociação (*Melt curve*) específica para os *primers* BruAb_0168. Como controle negativo foi utilizado material livre de DNA; como controle positivo o DNA de *B. abortus* S2308; amplificação de um produto referente a *B. abortus* utilizando o DNA de um animal abatido em frigorífico com lesão sugestiva e animal negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação (T_m).

Para a confirmação da especificidade da reação, foram utilizados na qPCR, DNA de quatro animais provenientes de uma propriedade certificada pelo MAPA como livre de brucelose. Todos os animais apresentaram-se negativos (Figura 5), confirmando assim a especificidade da técnica e dos *primers* BruAb_0168.

Com a realização da curva padrão (Figura 6) foi possível a quantificação da bacteremia de *B. abortus* por qPCR utilizando-se SYBR GREEN de 9 dos 20 animais avaliados (Tabela 2), por meio da amplificação do produto específico (Figura 7).

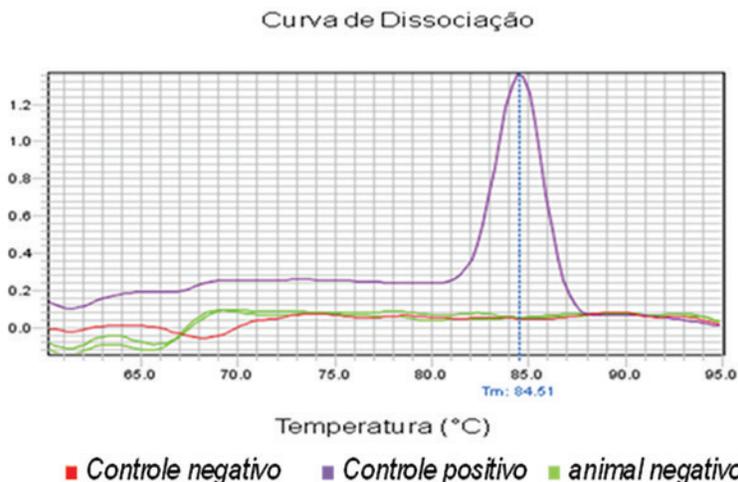


Figura 5. Curva padrão de dissociação (*Melt curve*) específica para os *primers* Bru-Ab_0168 com DNA de *B. abortus* cepa virulenta S2308 como controle positivo, DNA do animal certificado pelo MAPA como negativo para brucelose e controle negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação (T_m).

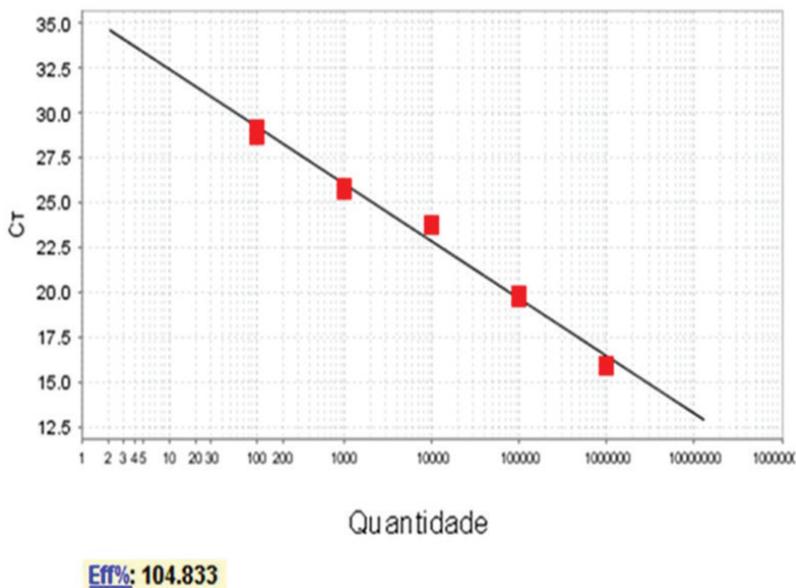


Figura 6. Curva padrão do teste de sensibilidade dos *primers* BruAb_0168 com DNA da cepa padrão *B. abortus* S2308. O eixo Y (Cq - Ciclo de Threshold) corresponde ao ciclo limiar de amplificação, e o eixo X à concentração de DNA na amostra.

Curva de Dissociação

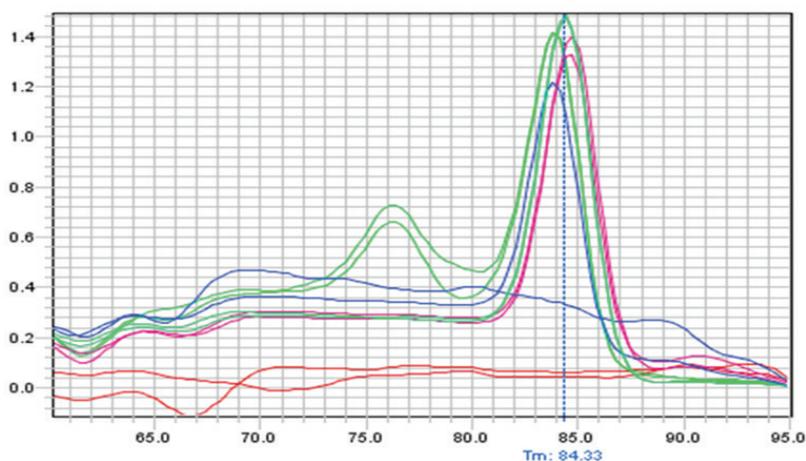


Figura 7. Padrão da curva de dissociação (*Melt curve*) específica para os *primers* BruAb_0168 com DNA de *B. abortus* S2308 como controle positivo, animal quantificado, animais não quantificados e controle negativo. O eixo Y corresponde ao repórter derivado (-Rn) e o eixo X corresponde à temperatura de dissociação.

Tabela 2. Tabela da quantificação dos animais positivos na qPCR para *B. abortus* utilizando-se os *primers* BruAb_0168 por meio da curva de amplificação com SYBR GREEN.

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

^aTemperatura de Dissociação, ^bQuantificação referente ao número de cópias do DNA da bactéria/ μ L.

Das 20 amostras obtidas de bovinos abatidos em diferentes frigoríficos de MS, foi possível constatar uma variação nos resultados encontrados pelos diferentes testes (Tabela 3). Porém, embora houvesse essa variação, foi possível observar que a espécie *B. abortus* foi encontrada em 100% das amostras analisadas, considerando a positividade de todos os testes.

Tabela 3. Resultados do isolamento, PCR e qPCR para detecção de *Brucella* spp. de animais de frigoríficos de MS que apresentavam lesões sugestivas de brucelose.

Amostra	Isolamento	AMOS-PCR Colônias isoladas	PCR BruAb DNA sangue	qPCR BruAb DNA sangue
1	+	<i>B. abortus</i>	+	+
2	+	<i>B. abortus</i>	+	+
3	-	-	-	+
4	+	B19	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	+	-	+	+
9	+	<i>B. abortus</i>	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	<i>B. abortus</i>	+	+
13	-	-	+	+
14	-	-	+	+
15	+	<i>B. abortus</i>	+	+
16	-	-	+	+
17	+	-	-	-
18	-	-	+	+
19	+	<i>B. abortus</i>	+	+
20	+	<i>B. abortus</i> /B19	+	+

A concordância entre os testes diagnósticos avaliados foi baseada no índice kappa (Tabela 4). Essa abordagem permitiu confirmar a maior eficácia da PCR e qPCR de DNA do sangue pois, ambas tiveram o maior índice de concordância. O método menos eficiente foi o isolamento bacteriano que, quando comparado aos outros métodos, apresenta os menores índices kappa.

Tabela 4. Concordância entre os testes diagnósticos baseada no teste kappa. Os testes comparados foram: Isolamento bacteriano (ISO), DNA do sangue seguido de PCR convencional (PCR Bruab) e DNA do sangue seguido de qPCR (qPCR Bruab).

Teste Diagnóstico	Índice Kappa	Concordância
ISO vs PCR BruAb	0,048	Pouca concordância
ISO vs QPCR BruAb	0,098	Pouca concordância
PCR BruAb vs qPCR Bru- Ab	0,706	Concordância substancial

Por meio dos resultados obtidos, observa-se variação na frequência da detecção de *B. abortus* nos diferentes testes diagnósticos. Ao analisar a significância estatística desses diferentes resultados, pode-se constatar que somente as técnicas de PCR e qPCR aplicadas no DNA do sangue são significativas (Figura 8).

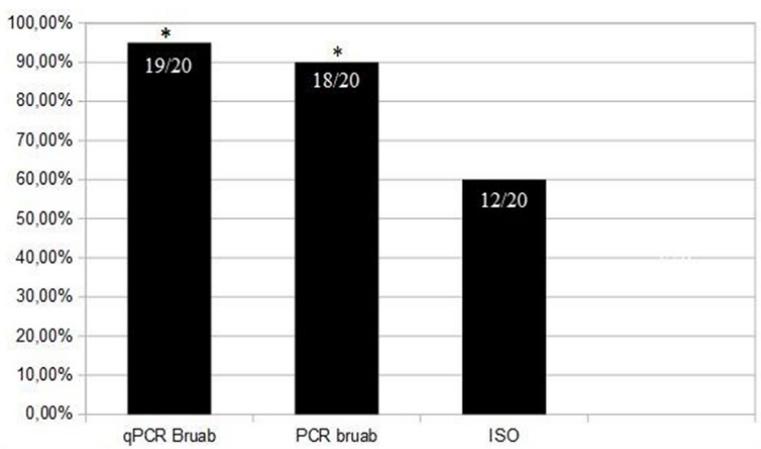


Figura 8. Frequência de amostras positivas para *Brucella* spp. através dos testes diagnósticos Isolamento bacteriano (ISO), PCR de DNA de sangue (PCR Bruab) e qPCR de DNA de sangue (qPCR Bruab). O (*) mostra os testes diagnósticos que apresentaram significância estatística considerando $P < 0,05$, PCR Bruab apresentou $P < 0,0002$ e qPCR Bruab $P < 0,0001$.

Discussão

O diagnóstico da brucelose é uma etapa importante do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, pois a base de um programa para o controle de uma doença está relacionada com a correta identificação dos animais infectados (POESTER *et al.*, 2005).

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

Devido às exigências cada vez maiores por qualidade sanitária da carne bovina por países importadores, é de fundamental importância que tenhamos métodos de diagnóstico post-mortem que sejam confiáveis e rápidos de serem executados na linha de frente de abatedouros, assim que uma carcaça seja identificada como suspeita de uma doença, ainda mais se esta doença for uma zoonose, como brucelose.

A exposição máxima da brucelose em humanos é observada entre os médicos-veterinários, técnicos de inseminação, zootecnistas, produtores rurais e funcionários de empresas de processamento de carne. As vias mais frequentes de infecção são mucosas, vias aéreas, a pele danificada das mãos durante o contato direto com placenta infectada, fetos abortados ou líquido amniótico, a execução de procedimentos ginecológicos em bovinos, (GALIŃSKA e ZAGÓRSKI, 2013), além do consumo de leite não pasteurizado e seus derivados contaminados (NICOLETTI, 1989).

Os métodos moleculares têm sido cada vez mais aperfeiçoados e promissores frente ao desafio de se obter um método rápido e acurado na detecção da brucelose bovina post e ante-mortem. Portanto, a meta neste estudo foi verificar a eficiência da PCR e/ou qPCR de DNA de sangue de bovinos comparadas ao teste padrão de isolamento de cultura.

Neste estudo, dos 20 bovinos analisados, 60% foram positivos pelo método de isolamento, 40% destes isolados foram confirmados pela AMOS-PCR, 90% e 95% foram positivos pelas técnicas de PCR e qPCR de DNA de sangue, respectivamente.

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

O método de isolamento, considerado padrão ouro, possui alta especificidade e capacidade de diferenciação entre as espécies. No entanto, a identificação de *Brucella* spp. é um processo lento, caro e de alto risco para o executor, pois envolve a manipulação de materiais contaminados e também exige meios de cultivos seletivos (LAGE *et al.*, 2008; CORBEL *et al.*, 2006), e exige também a utilização de normas escritas de biossegurança (CHOSEWOOD e WILSON, 2007).

Nas colônias isoladas deste estudo em 12 amostras (60%), foi realizada a técnica AMOS-PCR, desenvolvida por Bricker e Halling (1994) para diferenciar *Brucella* em nível de espécies. Este ensaio é espécie-específico correspondendo à identificação de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* e *Brucella suis* (AMOS) e baseia-se no local de inserção do elemento IS711. Esses mesmos autores aprimoraram esta técnica, adicionando oligonucleotídeos capazes de diferenciar animais naturalmente infectados com cepas de campo de animais positivos para as cepas vacinais B19 e RB51 (BRICKER e HALLING, 1995). Das 8 amostras positivas pela AMOS-PCR, obteve-se 7 isolados como positivos para *Brucella abortus* biovars 1, 2 ou 4; e dois isolados para a cepa vacinal B19. Todos os animais positivos na AMOS-PCR eram fêmeas com idade igual ou superior a 4 anos. Hipóteses para o isolamento da amostra vacinal nestes animais pode ser, devido a vacinação após 8 meses de idade, aplicação de doses elevadas, e/ou animais imunodeprimidos (SHURIG *et al.*, 2002).

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

As reações de qPCR foram realizadas neste estudo com os *primers* BruAb_0168, descritos por Hinic *et al.* (2008) utilizando-se o DNA extraído

do sangue total dos animais. As amplificações resultaram em fragmentos de DNA com temperatura média de dissociação (T_m) de 84,42°C e mostraram-se sensíveis, detectando 95% (19/20) dos animais positivos, e apenas um animal negativo (Figura 4). Nossos dados divergem de Seónadh *et al.* (2006) que realizaram um estudo avaliando o método convencional e qPCR para detecção de *B. abortus* em amostras de sangue, leite e linfonodo de vacas naturalmente infectadas, onde o sangue não se mostrou uma amostra ideal para a detecção deste patógeno. Além disso, estes autores não encontraram vantagem no uso da qPCR sobre os métodos convencionais sorológicos e bacteriológicos.

Em vista dos resultados obtidos nesse projeto, juntamente com a análise estatística, pode-se observar que as técnicas de PCR e qPCR de DNA de sangue são mais eficientes, apresentando maior índice kappa e significância estatística baseada nos seus valores de P. No entanto a qPCR é mais vantajosa com relação a PCR convencional por ser uma técnica menos laboriosa, por menor tempo utilizado para concluir sua reação e principalmente por gerar resultados quantitativos, possibilitando assim a estimativa da bacteremia do animal (QUEIPO-ORTUÑO *et al.*, 2009).

Conclusão

Conclui-se que as técnicas de PCR e qPCR utilizando amostras de DNA de sangue total de bovinos abatidos em frigorífico mostraram-se mais eficientes na detecção de animais positivos post-mortem para brucelose, comparando-as ao método padrão de isolamento, com potencial de vir a ser utilizado, como um método rápido e eficiente.

Agradecimentos

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

Referências

- Acha, P. N. & Szyfres, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales. **Publicación científica**, 503 (2).
- Acha, P. N. & Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals* (Vol. 580). Pan American Health Org.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Pietz, D. E., & World Health Organization. (1975). Laboratory techniques in brucellosis.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la recherche Agronomique (INRA).
- Araújo, F. R., Ramos, C. D. N., Luiz, H. L., Péres, I. H. F. S., de Oliveira, R. H. M., de Souza, I. F. & Russi, L. D. S. (2009). Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Atluri, V. L., Xavier, M. N., De Jong, M. F., Den Hartigh, A. B. & Tsois, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annual review of microbiology**, 65, 523-541.
- Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S. M. & Contreras-Rodríguez, A. (2013). A history of the development of *Brucella* vaccines. **BioMed research international**, 2013.
- Barbosa, S. M. (2009). Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil. 77f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M. S., Poliak, S. & Garin-Bastuji, B. (2009). Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. **Veterinary microbiology**, 137(1-2), 156-164.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2006). *Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT): manual técnico*. MAPA/SDA/DSA.
- Bricker, B. J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary microbiology**, 90(1-4), 435-446.
- 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. **Journal of clinical microbiology**, 32(11), 2660-2666.
- Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(6), 1640-1642.
- Campaña, R., Gotardo, D. & Ishizuca, M. (2003). Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo: Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 20 p. Disponível em: < <http://www.zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=33079>> Acesso em: 13 abr. 2013.
- Chate, S. C., Dias, R. A., Amaku, M., Ferreira, F., Moraes, G. M., Costa Neto, A. A., ... & Ferreira Neto, J. S. (2009). Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(1), 46-55.

- Chosewood, L. C. & Wilson, D. E. (2007). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Washington: US Government Printing Office. 409 p.
- Carvalho, R. F. B. D., Santos, H. P., Mathias, L. A., Pereira, H. D. M., Paixão, A. P., Costa Filho, V. M. & Alves, L. M. C. (2016). Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 83, 01-06.
- Castro, H. A., González, S. R. & Prat, M. I. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(2), 203-216.
- Cloekaert, A.; Vizcaíno, N. (2004). DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. In: López-Goni, I.; Morón, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. 1.ed. England: Horizon Bioscience, 1-23.
- Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. World Health Organization.
- Farrell, I. D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. **Research in veterinary science**, 16(3), 280-286.
- Galinska, E. M. & Zagórski, J. (2013). Brucellosis in humans-etiology, diagnostics, clinical forms. **Annals of agricultural and environmental medicine**, 20(2), 233-238.
- Garshasbi, M., Ramazani, A., Sorouri, R., Javani, S. & Moradi, S. (2014). Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(2), 533-538.
- Gomes, R. D. C., Feijó, G. L. D. & Chiari, L. (2017). Evolução e qualidade da pecuária brasileira. Documentos/Embrapa Gado de Corte, ISSN, 1517-3747. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documentos/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>>. Acesso em: 20 Julho 2018.
- Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Ž., 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. **Journal of microbiological methods**, 75(2), 375-378.
- IBGE. Censo Agro 2017. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html>. Acesso em: 23 Jun 2018.
- Junqueira Junior, D. G., Lima, A. M. C., Rosinha, G. M. S., Carvalho, C. E. G., Oliveira, C. E. & Sanches, C. C. (2018). Detection of *Brucella abortus* B19 strain DNA in seminal plasma by polymerase chain reaction in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, 65(2), 476-479.
- Lage, A. P., Gonçalves, V. S. P. & Lobo, J. R. (2008). O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal em 2008. **Leite Integral**, 3, 40-46.
- Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics*, 33 (1), 159-174.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G., & Hwang, S. (2006). Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, 123(3), 273-280.
- Lira, N. S. C. D. (2008). Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intrapreputal e conjuntival simultaneamente. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP – Campus Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo.

- Martinez-Herrera, D. I., Padron-Tello, O., Peniche-Cardentilde, A., Villagomez-Cortes, J. A., Pulido-Camarillo, E., Lopez-Merino, A., ... & Flores-Castro, R. (2012). Identification of immunotolerance in the progeny of cows infected with *Brucella abortus*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(29), 5841-5846.
- Megid, J., Ribeiro, M. G., MARCOS JÚNIOR, G. & Crocci, A. J. (2000). Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 37(5), 395-399.
- Miyashiro, S., Scarcelli, E., Piatti, R. M., Campos, F. R., Vialta, A., Keid, L. B., ... & Genovez, M. E. (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). **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(1), 17-22.
- Mohamed, A. G., Ramadan, K. M., Monem, H. A., Essam, E. L. T. & Khairy, E. A. (2013). AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of infected and vaccinated cattle and sheep with brucellosis. **Global Veterinaria**, 10(6), 748-756.
- Neta, A. V. C., Mol, J. P., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, 184(2), 146-155.
- Nicoletti, P. L. (1989). Relationship between animal and human disease. **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**, 41-51.
- OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucellosis bovina (2004). In: **Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres**. Seção 2.3, Cap. 2.3.1, p. 445-476.
- 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(2), 170-176.
- Oliveira, A. L. B., de Macedo, G. C., Rosinha, G. M. S., Melgarejo, J. L., Alves, A. G. L., Barreto, W. T. G., ... & de Oliveira, C. E. (2019). Detection of *Brucella* spp. in dogs at Pantanal wetlands. **Brazilian Journal of Microbiology**, 50(1), 307-312.
- Pacheco, W. A., Genovez, M. E., Pozzi, C. R., Silva, L. M. P., Azevedo, S. S. D., Piatti, R. M., ... & Gambarini, M. L. (2012). Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. **Brazilian Journal of Microbiology**, 43(2), 594-601.
- Paulin, L. M., & Ferreira Neto, J. S. (2003). O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. 1a ed., Jaboticabal, Ed. Funep.
- Paulin, L. M. S., & Ferreira Neto, J. S. (2008). Brucelose em búfalos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 75(3), 389-401.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in applied microbiology**, 8(4), 151-156.
- Poester, F. P., Samartino, L. E. & Lage, A. P. (2005). Diagnóstico da brucelose bovina. **Cad. Téc. Vet. Zootec**, 47, 13-29.
- Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D., Bermudez, P., Bravo, M. J. & Morata, P. (2009). Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay. **PLoS One**, 4(2), e4526.
- Reis, L. B. D. (2015). Avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunomodulação induzida pela bactéria *Brucella abortus*. 92f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP) – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

- Sangari, F. J., García-Lobo, J. M. & Agüero, J. (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letters**, 121(3), 337-342.
- Santos, R. L., Martins, T. M., Borges, Á. M. & Paixão, T. A. (2013). Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(6), 759-764.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. & Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary microbiology**, 90(1-4), 479-496.
- Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary microbiology**, 140(3-4), 392-398.
- Silva, J., Moraes, C. M. D., Silva, C. L., Sales, G. A., Keid, L. B., Matos, P., ... & Moraes, C. C. (2016). *Brucella abortus* detected in cheese from the Amazon region: differentiation of a vaccine strain (B19) from the field strain in the states of Pará, Amapá and Rondônia, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(8), 705-710.
- Sola, M. C. (2011). 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 (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade Federal de Goiás e Escola Veterinária de Zootecnia, UFG, Goiânia.
- Soto-Varela, Z. E., Gutiérrez, C. G., de Moya, Y., Mattos, R., Bolívar-Anillo, H. J. & Villarreal, J. L. (2018). Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto. **Biomédica**, 38, 30-36.
- Vejarano Ruibal, M. D. P. & Ferreira Neto, J. S. (2009). 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. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Walker, R. L. (2003). *Brucella* In: HIRSH, D.C.; EE, Y. C. (Ed.), **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.
- Waltman, W. D. (2000). Methods for cultural isolation. *Salmonella* in domestic animals. In: Wray & Wray. **Salmonella in Domestic Animals**. USA, New York, 355-372.
- WHO - World Health Organization Joint FAO/WHO. **Expert Committee on Brucellosis**. 2009.
- Zamanian, M., Hashemi Tabar, G. R., Rad, M. & Haghparast, A. (2015). Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. **Archives of Iranian Medicine**, 18(1), 44-50.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 15800