

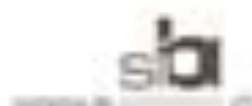
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EMPREGO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE
DNA DE *BRUCELLA* spp EM LESÕES DE CARÇAÇAS E VÍSCERAS
PROVENIENTES DE MATADOUROS-FRIGORÍFICOS SOB INSPEÇÃO
FEDERAL**

Marília Cristina Sola

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

GOIÂNIA
2011



Termo de Cessão e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TDE-D) na Biblioteca Digital de UFG

No qualidade de titular dos direitos de autor, autor(es) a Universidade Federal de Goiás (UFG) e depositante gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD(UFG), sem resguardo dos direitos autorais de acordo com a Lei nº 9.610/1998, o documento confere permissão aos usuários abaixo, para fins de leitura, impressão sem finalidade e não de distribuição de produção científica travada, a partir deste termo.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: **Maíla Cristina São** E-mail: mailla@ufg.br

Seu e-mail pode ser disponibilizado no portal? Sim Não

Unidade (Instituição) do autor:

Agência de Fomento: **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**

País: **Brazil** UF: **GO** CNPq: **303401**

Título: **Emprego da técnica de PCR em Tempo Real na detecção de DNA de *Shigella* spp em lesões de caracóis e vísceras provenientes de matadouro frigorífico sob inspeção Federal**

Palavras-chave: **lesões, carnis PIA/EUA, julgamento de caracóis e vísceras**

Título em outro idioma: **Real time PCR detection of *Shigella* spp in lesions of caracoles and viscera from slaughterhouses under Federal inspection**

Palavras-chave em outro idioma: **lesões, PIA/EUA, caril, víscera of caracoles and viscera**

Área de concentração: **Saúde Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data Index: **20102011**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Orientador: **Prof. Dr. Robinson José de Rezende** E-mail: roreza@cpa.ufg.br

Coorientador (1): **Dr. Eunice Antônia G. da Veiga Jardim** E-mail: eunice@cpa.ufg.br

Coorientador (2): **Prof. Dr. Francisco de Carvalho Das Fitas** E-mail: dfitas@ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização? Sim Não

Em caso de disponibilização parcial, indique as permissões:

Capítulos, Específicos

Outros materiais

Quando concordado com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível a entrega do(s) original(is) em formato digital PDF ou DOC de base de dados.

A Biblioteca da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e as dissertações, antes de sua disponibilização, recebendo previamente de segurança, integridade para não permitir cópia e extração de conteúdos, permitindo apenas impressão feita usando o botão de Imprimir.

Goiana, 24 março de 2011.

Maíla Cristina São
Assinatura (nome completo)

¹ Em caso de cópia, não poderá ser usada por um terceiro a partir da data de entrega. A responsabilidade por eventuais permissões para a reprodução do texto. Não possui a finalidade de criar sempre disponibilizada.

MARÍLIA CRISTINA SOLA

**EMPREGO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE DNA
DE *BRUCELLA* spp EM LESÕES DE CARÇAÇAS E VÍSCERAS
PROVENIENTES DE MATADOUROS-FRIGORÍFICOS SOB INSPEÇÃO
FEDERAL**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Higiene, ciência, tecnologia e inspeção de alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita-EV/UFG

Comitê de Orientação:

Dr. Eurione Antonio Garcia da Veiga Jardim-CPA/EV/UFG

Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho- EV/UFG

GOIÂNIA
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S684e Sola, Marília Cristina.
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 [manuscrito] / Marília Cristina Sola. - 2011.
96 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita;
Co-Orientadores: Prof. Dr. Eurione Antônio G. da Veiga Jardim;
Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas, quadros e abreviaturas.

Apêndices.

1. Brucelose 2. Julgamento de carcaças e vísceras 3. Métodos moleculares. I. Título.

CDU:619:616.98

MARLIA CRISTINA SOLA

Dissertação defendida e aprovada em 28/02/2011, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Abelton José de Mesquita
(Orientador (A))


Dr. José Gabriel Amorim - MAPA


Profa. Dra. Maria Cláudia Denton Porfiro B. Andre - IPTS/UFPA

A minha mãe, Nylbe Nicula. Pelo amor
incondicional, exemplo e por fazer de
meus sonhos, seus sonhos.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela força e coragem nos momentos difíceis e por sempre me guiar para que tomasse as melhores decisões.

À minha mãe, fonte de amor e exemplo de perseverança. Obrigada pelas palavras de carinho, pelo apoio e por nunca me deixar desistir nos momentos de incertezas, desafios e principalmente de saudade. Definitivamente, você é tudo para mim!

Aos meus familiares, pelo apoio, pelas preces e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Albenones José de Mesquita, pela amizade, dedicação, confiança, exemplo e pelos valiosos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais.

Ao meu co-orientador, Dr. Eurione Antonio Garcia da Veiga Jardim pela amizade, confiança e colaboração.

À Prof^a. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende pela amizade, apoio e exemplo.

Aos Fiscais Federais Agropecuários e agentes de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do estado de Goiás, que de forma valiosa contribuíram para a execução deste trabalho.

A toda equipe do Centro de Pesquisa em Alimentos, em especial aos amigos e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular: Adriano Queiroz de Mesquita, Bruno Moura Passos, Nadielly Xavier, Thatyana Lacerda, Lara Bueno, Fernanda Bernardes, Wesdras Martins, Ariane Rollins, Kelly Nobre, Ana Cristina Veiga, Giselly Prado e Jordana Carrijo. Obrigada por todo o apoio, carinho, amizade, paciência e pelos bons momentos vividos durante esta jornada. Vocês estão no meu coração!

Aos meus amigos Ana Luiza Ticly, Eliane Pereira Mendonça, Pablo Noletto, Taísa Gomes e Veridiana Rodrigues. Obrigada pela amizade, pelas palavras de carinho e por estarem ao meu lado - mesmo ao telefone - em todos os momentos. Vocês são a prova de que a distância é mero detalhe quando os sentimentos são verdadeiros. Por isso, só tenho a dizer que adoro vocês e que nossa amizade será eterna.

Às minhas amigas Juliana Dias Martins e Patrícia Soares, por estarmos juntas nesta segunda fase de nossa vida acadêmica. Foi muito bom podermos continuar trilhando os mesmos caminhos, estreitarmos os laços de amizade e nos apoiarmos durante mais esta jornada.

Aos amigos e colegas de Pós-graduação, em especial ao Adriano Queiroz de Mesquita, que com sua atenção e amizade esteve sempre disposto a ajudar. E à Thaysa dos Santos Silva, pela amizade e por muitos momentos de convivência e estudo.

À minha amiga Marcelle Louise, pelo carinho, apoio e por me apresentar o lado mais divertido de Goiânia.

À minha eterna vizinha Ana Lúcia Sartori, pela amizade e por compartilhar os mesmos sentimentos e vivências, mesmo que por um curto período.

Ao programa de Pós-graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

À CAPES, por fornecer apoio financeiro essencial para que eu pudesse dedicar-me integralmente às atividades de Pós-graduação.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

"Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a Providência Divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, seguem-se todas as formas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia."

Goethe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Conceito e histórico.....	4
2.2 Características do agente.....	5
2.3 Epidemiologia.....	7
2.4 Patogenia e sinais clínicos.....	10
2.5 Mecanismos de transmissão.....	14
2.6 Diagnóstico.....	18
2.6.1 Métodos Indiretos.....	18
2.6.2 Métodos Diretos.....	19
2.7 Controle.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Definição de amostra.....	34
4.2 Diagnóstico de brucelose em estabelecimentos de abate.....	34
4.3 Colheita de amostras.....	34
4.4 Detecção de DNA do gênero <i>Brucella</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real.....	35
4.4.1 Eluição do DNA genômico.....	35
4.4.2 Quantificação do DNA.....	36
4.4.3 PCR em Tempo real.....	36
4.5 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp por meio da técnica de PCR em Tempo Real.....	41
5.2 Lesões macroscópicas sugestivas de brucelose.....	43
5.2.1 Resultados divergentes quanto à presença do DNA de <i>Brucella</i> spp.....	48
5.3 Caracterização dos animais avaliados.....	50
5.3.1 Quanto à procedência dos animais de abate.....	50

5.3.2 Quanto ao sexo.....	51
5.3.3 Quanto à idade.....	53
5.4 Método FTA [®] Elute.....	53
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação das curvas de amplificação do DNA de <i>Brucella</i> spp e do controle positivo interno (IPC) em amostras de lesões sugestivas de brucelose.....	39
FIGURA 2- Frequência de detecção do DNA de <i>Brucella</i> spp em animais com suspeita de brucelose por meio da técnica de PCR em Tempo Real.....	41
FIGURA 3- Frequência de detecção do DNA de <i>Brucella</i> spp em lesões sugestivas por meio da técnica de PCR em Tempo Real.....	41
FIGURA 4- Frequências de detecção de DNA do gênero <i>Brucella</i> de acordo com lesões macroscópicas colhidas em carcaças e vísceras de bovinos.....	43
FIGURA 5- Lesão positiva para DNA de <i>Brucella</i> spp: bursite cervical em bovino, macho, acima de 4 anos.....	45
FIGURA 6 - Lesão positiva para DNA de <i>Brucella</i> spp: bursite cervical em bovino, macho, com até 3 anos.....	45
FIGURA 7 - Ausência de DNA de <i>Brucella</i> spp em lesão de bursite cervical: bovino, fêmea, com até 3 anos de idade.....	46
FIGURA 8 - Presença de DNA de <i>Brucella</i> spp em alteração inflamatória no linfonodo retrofaríngeo de bovino, macho, acima de 4 anos.....	47
FIGURA 9 - Frequências de detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp quanto à procedência dos animais de abate.....	50
FIGURA 10- Modelo de solicitação para encaminhamento de amostras.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Frequência de detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp por PCR em Tempo Real em lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal do estado de Goiás, no período de janeiro a outubro de 2010, Goiânia-GO, 2011.....	44
TABELA 2- Distribuição de frequência dos animais avaliados, segundo as mesorregiões do estado de Goiás, Goiânia, 2011.....	50
TABELA 3 - Frequência de detecção do DNA de <i>Brucella</i> spp em função do sexo, Goiânia-GO, 2011.....	52
TABELA 4 - Frequência de detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp em função da idade, Goiânia-GO, 2011.....	53
TABELA 5 - Determinação das variáveis analisadas quanto à detecção do DNA de <i>Brucella</i> spp em bovinos abatidos suspeitos de brucelose, Goiânia, 2011....	78
TABELA 6 - Distribuição de frequência dos animais avaliados e de positivos quanto à detecção do DNA de <i>Brucella</i> spp, segundo os municípios de origem, Goiânia, 2011.....	79

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Sequências de iniciadores e sonda utilizadas para amplificação do DNA de <i>Brucella</i> spp pela reação em cadeia da polimerase em Tempo real.....	37
QUADRO 2 - Distribuição das estirpes bacterianas e amostras diversas utilizadas como controles no teste de especificidade dos iniciadores.....	38
QUADRO 3 - Condições de amplificação do DNA por meio da reação de PCR em Tempo Real.....	38
QUADRO 4 - Distribuição das amostras de bovinos sugestivas de brucelose encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal no período de janeiro a outubro de 2010.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

%	por cento
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
2-ME	Teste do 2- mercaptoetanol
AAT	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado
BA	Bahia
bv.	biovariedades ou biovar
C-ELISA	Competitive -Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	Cycle threshold
DF	Distrito Federal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISA-I	Indirect -Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ES	Espírito Santo
et al.	e colaboradores
FC	Reação de Fixação do Complemento
FTA[®]	Flinders Technnology Associates
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
GO	Goiás
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
IPC	Controle positivo interno
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
mL	mililitro
mM	miliMolar
MT	Mato Grosso
ng	nanograma
nm	nanômetro

OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OR	Odds Ratio; razão de chance
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PR	Paraná
RBT	Teste Rosa Bengala
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SAR	Soroaglutinação Rápida em Placa
SAT	Soroaglutinação Lenta em Tubo
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SP	São Paulo
TAL	Teste de Anel em Leite
TE	Tris-EDTA
TO	Tocantins
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
µg/mL	micrograma por mililitro

RESUMO

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acomete o homem e diferentes espécies animais. Apesar da implementação de programas que visam o controle e a erradicação da enfermidade, apresenta-se endêmica em muitos países, principalmente aqueles em desenvolvimento, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção e sérias implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico. A doença pode ser transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados e anexos fetais e, ainda, veiculada ao homem pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e seus derivados que não passaram por processamento térmico. Pode ser veiculada também por meio de carnes cruas e pela própria manipulação de carcaças e vísceras durante o abate sanitário. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) instituído no país em 2001 determina como uma das medidas sanitárias, o diagnóstico dos animais, a fim de estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização do agente. Neste contexto, visando um diagnóstico rápido, seguro e preciso desta enfermidade em bovinos, objetivou-se detectar o DNA de *Brucella* spp por meio da técnica de PCR em Tempo Real em lesões sugestivas identificadas durante a inspeção sanitária de rotina em matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal no estado de Goiás. Tais lesões abrangeram a bursite cervical, lesões testiculares, pulmonares, hepáticas e de linfonodos mandibular, retrofaríngeo, esofageano, intercostal, apical, mediastínico, traqueobrônquico, inguinal, isquiático, poplíteo e mesentérico. Para tanto, no procedimento de colheita de amostras, foram utilizados cartões de celulose destinados ao armazenamento de material biológico (cartão FTA[®] Elute), por impregnação do material na matriz fibrosa do cartão. As análises laboratoriais foram efetuadas em 47 amostras provenientes de fluidos e tecido animal, colhidas em carcaças e vísceras de 40 bovinos com suspeita de brucelose e desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LBM/CPA/EVZ/UFG). Detectou-se o DNA de *Brucella* spp em 42,5% dos bovinos que apresentaram lesões sugestivas e em 38,3% das amostras totais. Verificou-se que o emprego da técnica de PCR em Tempo Real associada ao método FTA[®] Elute, é uma ferramenta de diagnóstico importante no processo de julgamento e destino de carcaças e vísceras dos animais de abate, tendo em vista que confere agilidade e eficiência no diagnóstico das enfermidades, auxiliando o Serviço de Inspeção Federal no cumprimento de sua missão, ou seja, de colocar à disposição do consumidor, alimentos seguros.

Palavras-chave: brucelose, cartão FTA[®] Elute, julgamento de carcaças e vísceras.

ABSTRACT

Brucellosis is a chronic infectious disease caused by bacterium of the genus *Brucella*, which affects humans and different species of animals. Despite the implementation of programs aimed at the disease controlling and eradicating, brucellosis is endemic in many countries, especially in developing ones, resulting in significant economic losses and serious implications for animal and public health, due to its zoonotic character. The disease can be transmitted by direct or indirect contact with infected animals, fetal membranes, and also transmitted to humans by contaminated animal products, especially milk and dairy products that have not undergone thermal processing, by raw meat and the handling of carcasses and viscera at the slaughterhouse. The National Programme for Control and Eradication of Brucellosis (PNCEBT), established in the country in 2001, determines the diagnosis of animals in order to establish both the distribution and characterization of the agent. In this context and seeking for a rapid, safe and precise diagnosis of this disease in cattle, we aimed to detect *Brucella* spp by real time PCR in suspect lesions detected during routine inspection in slaughterhouses under Federal Inspection in the state of Goiás, Brazil. Such lesions were related to cervical bursitis, testicular, lung and liver lesions and also in mandibular, retropharyngeal, esophageal, intercostal, apical, mediastinal, tracheobronchial, inguinal, ischiatic, popliteal and mesenteric lymphnodes. In the sampling procedure, cellulose cards were used for storage of biological material (card FTA[®] Elute) by impregnating the material in the fibrous matrix of the card. Laboratory analyses were performed on 47 samples from animal tissue and fluids, collected from carcasses and viscera at 40 bovines suspected of brucellosis. Samples were processed at the Laboratório de Biologia Molecular from the Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária e Zootecnia from Universidade Federal de Goiás (LBM / CPA / EVZ / UFG). *Brucella* spp was detected in 42.5% of the bovines with suspect lesions and in 38.3% of samples. It was verified that the use of real-time PCR associated with the FTA[®] Elute method is an important diagnostic tool in the process of trial and disposition of carcasses and viscera of slaughtered animals and it gives flexibility and efficiency for the diagnosis of diseases, helping the Federal Inspection Service in fulfilling its mission of providing safe food to consumers.

Keywords: brucellosis, FTA[®] Elute card, trial of carcasses and viscera.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira apresenta-se como um dos grandes esteios da economia de nosso país. Possui um rebanho de 205.292 milhões de cabeças e revela avanços nos índices de produção, com destaque para a produtividade e para a exportação de seus produtos (IBGE, 2010).

Em termos de comercialização, o Brasil atende as expectativas de demanda e sanidade, e ocupa posição estratégica entre os grandes fornecedores mundiais. No ano de 2010, as exportações brasileiras de carne bovina *in natura* e industrializadas somaram 2 milhões de toneladas que foram comercializadas para mais de 180 países nos cinco continentes (NASSAR, 2010).

No entanto, ao mesmo tempo em que o Brasil busca aumentar ainda mais seus índices de produtividade, sente a necessidade de melhorar a qualidade de seus produtos, principalmente a sanitária. A rastreabilidade e os programas voltados para a sanidade animal, envolvendo o controle e erradicação de doenças através de vacinações, tratamentos e profilaxia, são requisitos fundamentais para que o país possa manter-se como exportador e, principalmente, expandir a competitividade no mercado.

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Apresenta-se na forma endêmica em muitos países, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção e sérias implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico.

A ocorrência de brucelose bovina em um país ou região pode resultar em perdas econômicas significativas como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal. Provoca perdas no rendimento industrial com a condenação do leite e da carne oriundos de animais infectados, gastos significativos devidos aos altos custos para a implementação dos programas de controle e erradicação da doença, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezerras fracas, baixa fertilidade nas propriedades rurais e principalmente o declínio na produção de leite e carne.

A brucelose pode ser veiculada ao homem pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e derivados que não passaram por processamento térmico e transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados, fetos abortados ou anexos fetais, além da própria manipulação de carcaças e vísceras no abate sanitário. As principais manifestações clínicas são as febres recorrentes, fraquezas, dores musculares, distúrbios nervosos e sudorese, o que acaba por levar à incapacidade parcial ou total ao trabalho.

Visando o controle da brucelose bovina, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001 no Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) que consiste em um conjunto de medidas sanitárias buscando uma importante redução na prevalência e na incidência da brucelose e tuberculose. Dentre as medidas, destacam-se a vacinação obrigatória de fêmeas, com idade entre 3 e 8 meses e a certificação de propriedades livres ou monitoradas para as doenças. São esperados benefícios sanitários e econômicos com a redução dos prejuízos ocasionados pelas doenças, aumento na competitividade da pecuária nacional, diminuição do impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e maior credibilidade sanitária dos produtos de origem animal (BRASIL, 2006).

O diagnóstico de uma enfermidade é fundamental para se estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização do agente. Nesse contexto, a brucelose animal pode ser diagnosticada por meio de diferentes métodos, de forma isolada ou em conjunto. O diagnóstico clínico baseia-se na presença de sinais como aborto, nascimento de bezerros fracos, retenção de placenta e esterilidade de machos e fêmeas. O epidemiológico, no histórico dos rebanhos nas propriedades e o laboratorial, no isolamento e identificação do agente etiológico, na detecção do DNA dos microrganismos, e na presença de anticorpos nos fluidos orgânicos.

Na rotina de inspeção sanitária da carne, os médicos veterinários não possuem meios de diagnóstico específicos que os permitem associar as alterações observadas durante a inspeção sanitária *post-mortem* com a infecção brucélica. Este desafio conduz a busca de alternativas que possam proporcionar

segurança e rapidez no diagnóstico das diversas lesões identificadas no decorrer das atividades de inspeção nos estabelecimentos de abate.

Neste contexto, o método de diagnóstico molecular PCR em Tempo Real, que detecta o DNA de *Brucella* spp em fluidos e tecido animal provenientes de matadouros-frigoríficos de bovinos, pode constituir uma ferramenta de grande valia, a fim de garantir um diagnóstico seguro, rápido e preciso que auxilie no processo de tomada de decisão quanto ao critério de julgamento das carcaças e vísceras dos animais de abate, conferindo assim o destino seguro e adequado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito e histórico

A brucelose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*, principalmente pela *Brucella abortus*. Caracteriza-se por ser um problema grave ligado à saúde pública, causar elevados prejuízos econômicos e ser uma zoonose de distribuição mundial (BRASIL, 2006).

A brucelose foi descrita no homem, pela primeira vez, por Marston em 1859, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

Em 1887, Sir David Bruce, médico inglês, isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados britânicos, mortos na Ilha de Malta, denominando-a como *Micrococcus melitensis* (VIEIRA, 2004; GODFROID et al., 2005; POESTER et al., 2009).

Bernhard Bang, um patologista veterinário dinamarquês, isolou em 1895, um microrganismo do útero e membranas fetais resultantes do aborto de vacas, identificando-o como *Bacillus abortus* (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

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

Nos EUA, Alice Evans, em 1918, demonstrou que as bactérias isoladas por Bruce e Bang apresentavam similaridades morfológicas, imunológicas e de cultivo. Em razão disto, Meyer e Shaw em 1920, propuseram a criação do Gênero *Brucella*, em homenagem ao autor do primeiro isolamento do agente, além da designação dos dois microrganismos por *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*, respectivamente (CORRÊA & CORRÊA, 1992; VIEIRA, 2004; RIBEIRO et al., 2008).

Jacob Traum, em 1914, isolou a partir de fetos abortados de suínos, um microrganismo similar aos agentes descritos por Bruce e Bang, sendo confundida a princípio, como a causadora dos abortos nos bovinos. Posteriormente, foram

verificadas as diferenças entre os isolados, em função de algumas propriedades de cultivo, bioquímicas e antigênicas, incluindo o agente em outra espécie denominada *Brucella suis* (HUDDLESON, 1931). A partir de então, outras espécies foram acrescentadas ao gênero, seguindo-se: *Brucella ovis* (ovinos) (BUDDLE, 1956), *Brucella neotomae* (roedores silvestres) (STOENNER & LACKMAN, 1957), *Brucella canis* (canídeos) (CARMICHAEL & BRUNER, 1968), *Brucella pinnipedialis* (focas e golfinhos) (FOESTER et al., 2007), *Brucella ceti* (baleias) (FOSTER et al., 2007), *Brucella microti* (isoladas de roedores silvestre) (SCHOLZ et al., 2008) e *Brucella inopinata* (isolada em humanos) (SCHOLZ et al., 2010).

2.2 Características do agente

As bactérias do gênero *Brucella* pertencem à classe *Proteobacteria*, são Gram-negativas, intracelulares facultativas, imóveis e não esporuladas. Apresentam-se na forma de bastonetes curtos que medem de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (VELASCO et al., 2000; REDKAR et al., 2001; PROBERT et al., 2004). São consideradas microrganismos aeróbios, porém uma atmosfera com tensão de 5 a 10% de CO₂ favorece o isolamento de algumas espécies. Apresentam temperatura de multiplicação na faixa de 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo de 6.6 a 7.4 (PAJUABA, 2006; OIE, 2009).

Dentro deste gênero são descritas dez espécies independentes, classificadas principalmente por diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas. As espécies de *Brucella* e seus biovares são diferenciadas por meio de testes como a sorotipagem, tipificação de fagos, requerimentos de CO₂, sensibilidade a corantes, produção de H₂S, além das propriedades metabólicas (ALTON et al., 1988; PAJUABA, 2006; OIE, 2009).

As principais espécies do gênero são a *B. melitensis* (isoladas em cabras, ovelhas e camelos), *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. suis* (suínos e javalis), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovelhas) e *B. canis* (cães), as quais são subdivididas em sete biovares ou biotipos para *B. abortus* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), três

para *B. melitensis* (1, 2 e 3) e cinco para *B. suis* (1, 2, 3, 4 e 5) (MORENO et al., 2002; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008).

As outras espécies como *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas em mamíferos marinhos (focas, leões marinhos, golfinhos e baleias) e *B. microti* (procedente de ratazanas selvagens) não foram diferenciadas em biovares, apesar de existirem variantes dentro das cepas (CLOECKAERT et al., 2001; SCHOLZ et al., 2008).

Classicamente, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antígenicamente distintos, denominadas lisas ou rugosas, com base nas características de multiplicação em meios de cultura no cultivo primário e na constituição química da parede celular - presença ou ausência da cadeia O - um dos componentes do lipopolissacáride (LPS) localizado na superfície externa da *Brucella* spp e que possui relação com a virulência de algumas espécies (NIELSEN et al. 2004; CARDOSO et al., 2006).

As colônias lisas possuem como constituinte do LPS, o lipídeo A, o núcleo oligossacáride e a cadeia O. Já as rugosas, possuem como constituinte da membrana externa apenas o lipídeo A e o núcleo oligossacáride (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* normalmente apresentam morfologia de colônia lisa e quando sofrem mutações para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Já as espécies *B. canis* e *B. ovis* apresentam morfologia de colônia predominantemente do tipo rugosa (ALTON et al., 1988; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; MINHARRO, 2009; OIE, 2009).

A *Brucella* spp apresenta-se exigente quanto à multiplicação *in vitro*, porém possui uma ampla capacidade de sobrevivência em ambientes que apresentam condições de umidade, abrigo de luz solar direta, pH neutro, temperatura e matéria orgânica, podendo resistir em pastagens, fetos abortados, anexos fetais e fezes úmidas por longos períodos (CARVALHO et al., 1995; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006; OIE, 2009).

Todas as espécies do gênero são sensíveis ao calor e à acidez, e quando submetidas à ação de desinfetantes comuns, como soluções de formaldeídos a 2%, produtos clorados (2,5% de cloro ativo), compostos fenólicos a 2,5% e permanganato de potássio (1:5000), a eliminação de *Brucella* spp ocorre em no

máximo em 15 minutos. O álcool a 70% destrói imediatamente as bactérias enquanto o carbonato de cálcio (1:10) as elimina em trinta minutos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; OIE, 2009).

A sobrevivência de *Brucella* spp no leite e produtos lácteos depende da temperatura, pH e da presença de outros microrganismos que possam inibir a multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a viabilidade é mantida mesmo em temperatura de congelamento. Felizmente, a fervura, processos de pasteurização e os métodos de esterilização são eficazes na eliminação do microrganismo (CARVALHO et al., 1995; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

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

Os casos de brucelose por ingestão de carne ou derivados são raros, visto o número reduzido de bactérias no músculo e o raro consumo de carne crua. Já o consumo de sangue e medula óssea pode ser considerado veículo de transmissão da doença. A sobrevivência da *Brucella* spp em carnes depende do grau de contaminação no início do processo e do tipo de tratamento tecnológico empregado. Essas bactérias podem persistir nas células do sistema monocítico fagocitário, nas secreções uterinas, na glândula mamária e na medula óssea. Por isso, o descarte dos tecidos que concentram um grande número de bactérias pode diminuir ou até mesmo evitar a contaminação de carcaças e vísceras durante o abate (CARVALHO et al., 1995; PESSEGUEIRO et al., 2003; PARDI et al., 2006).

2.3 Epidemiologia

A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses. Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, continua re-emergente e se apresentando como um grave problema sanitário e econômico,

principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia (CORBEL, 1997; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; OIE, 2009).

No Brasil, a brucelose é endêmica, porém apresenta dados bastante diferenciados face à dimensão territorial e às características próprias de cada região (POESTER et al., 2002; RIBEIRO et al., 2008; LAGE et al., 2008).

De acordo com o estudo epidemiológico nacional realizado em 1975, a brucelose bovina encontrava-se disseminada por todo o território brasileiro. As prevalências estimadas por regiões foram: Norte, 4,1%; Nordeste, 2,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Sudeste, 7,5% e Sul, 4%. Posteriormente, outros inquéritos sorológicos, por amostragem, foram realizados por alguns estados, porém não foram evidenciadas grandes alterações em relação aos índices verificados em 1975. Os dados de notificações oficiais no período de 1988 a 1998 indicaram que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% (POESTER et al., 2002; BRASIL, 2006).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que consiste em um conjunto de medidas sanitárias estratégicas em busca da redução da prevalência e incidência da brucelose, implementando a vacinação compulsória de bezerras com idade entre 3 e 8 meses, em todo o país. Dentre outras atividades previstas no programa destacam-se a adesão voluntária dos criadores na busca de rebanhos livres e monitorados, a prática de testes sorológicos regulares em rebanhos de elite para a participação em feiras e exposições e o sacrifício dos animais positivos para brucelose (BRASIL, 2006).

Após a implementação do PNCEBT, foram realizados inquéritos seroepidemiológicos no período de 2001 a 2004 em 13 unidades federativas (BA, DF, ES, GO, MG, MT, PR, RJ, RS, SC, SE, SP e TO) a fim de conhecer a situação epidemiológica da doença no início do programa de controle, baseando-se na frequência e distribuição da enfermidade na população.

Os resultados revelaram que a brucelose encontra-se disseminada nas diversas áreas estudadas e a situação encontra-se heterogênea entre os diversos estados brasileiros e, até mesmo, entre regiões de um mesmo estado. Evidenciou-se também uma tendência de aumento da prevalência da brucelose

no sentido Centro-Oeste/Norte do país, principalmente nos estados tradicionais produtores de carne (POESTER et al., 2009).

O estado de Goiás tem grande importância no cenário nacional, uma vez que a produção de grãos, carnes e leite impulsiona a economia do país. A pecuária possui destaque quanto ao rebanho e, principalmente, quanto ao abate de animais, que atinge três milhões de cabeças de bovinos, 1,5 milhões de suínos e 257,2 milhões de aves (SILVA et al., 2010).

Condições geográficas, sociais e econômicas favorecem para diversificação e distribuição dos diferentes sistemas de produção em nosso estado. A população de bovinos concentra-se nas áreas especializadas de pecuária de corte, que incluem as regiões Noroeste, Norte-Nordeste e Centro-Oeste. Nas regiões Sul e Sudeste predominam a pecuária leiteira e nas Sudoeste e Centro, a atividade mista, ou seja, corte e leite.

Em inquérito epidemiológico visando estabelecer a prevalência da brucelose bovina e considerando as diferenças regionais quanto à sua epidemiologia, dividiu-se o estado de Goiás em três circuitos produtores, considerando-se os diferentes sistemas de produção, práticas de manejo, finalidades de exploração (rebanho de corte, leite ou misto), tamanho dos rebanhos e sistema de comercialização. Em cada circuito foram amostradas aleatoriamente 300 propriedades para determinação de focos, aplicando-se um questionário epidemiológico a fim de verificar quais os tipos de exploração e práticas de criação poderiam estar associadas ao risco de infecção pela doença. Além disso, dentro de cada propriedade, foi escolhido de forma aleatória, um número pré-estabelecido de animais, dos quais foi obtida uma amostra de sangue para a realização de testes sorológicos (ROCHA et al., 2009).

A prevalência de focos em propriedades no Estado de Goiás foi estimada em 17,5%, se aproximando dos 15%, determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a região Centro-Oeste, ao realizarem testes sorológicos de rotina nos rebanhos, no período 1986-1997 (BRASIL, 2001; PAULIN & FERREIRA NETO, 2002).

Quando se estudou a prevalência de propriedades infectadas - focos - em relação aos circuitos produtores, observou-se que o circuito 1 apresentou a menor prevalência (7,7%) quando comparado com os demais. Nestas regiões, estão

concentradas 22% das propriedades e 26% dos animais do estado, sendo caracterizadas pela produção extensiva com a finalidade, principalmente, de cria. Para o circuito 2, a prevalência de focos esteve em torno de 19,5%. Nesta região estão 45% das propriedades e 31% do rebanho goiano, predominando rebanhos de aptidão leiteira. A maior prevalência de focos (21%) foi verificada no circuito 3, onde estão concentradas 33% das propriedades e 43% do rebanho bovino, predominantemente de aptidão mista. Embora a maior prevalência de rebanhos positivos tenha sido encontrada no circuito 3, a diferença entre os circuitos 2 e 3 não foi estatisticamente significativa.

Já a prevalência de animais soropositivos em Goiás foi de 3,0%, valor inferior ao obtido no inquérito nacional na década de 1970 (BRASIL, 1977) de 11,6% e ao relatado por SANTANA & VEIGA (1982) que estimaram a prevalência para o estado em 9%.

Embora os circuitos 2 e 3 tenham apresentado maior concentração da doença, destacando elevadas prevalências de focos e animais soropositivos, não foram constatadas diferenças significativas entre os mesmos. Deve-se ressaltar também que, apesar da tendência de concentração da enfermidade nas propriedades de corte, a presença da brucelose no estado de Goiás, não se mostrou associada a características produtivas do rebanho, como aptidão leiteira ou corte, criação intensiva ou extensiva, raças, nem mesmo por tamanho do plantel.

2.4 Patogenia e sinais clínicos

A patogenicidade das bactérias do gênero *Brucella* está intimamente relacionada com os mecanismos que permitem sua invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular nas células do hospedeiro, mantendo-as protegidas da ação do sistema imune (ARÉSTEGUI et al., 2001; NIELSEN et al., 2004; XAVIER et al., 2009).

A infecção natural se inicia principalmente pelas mucosas oral, nasofaríngea, conjuntival ou por solução de continuidade da pele, sendo que a porta de entrada principal da *B. abortus* em bovinos é a mucosa orofaríngea

(BISHOP et al., 1994; GORVEL & MORENO, 2002; CAMPANÃ et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008).

Após a penetração na mucosa, as bactérias são fagocitadas principalmente por macrófagos, sendo carreadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses, levando à hiperplasia e linfadenite (BISHOP et al., 1994; LAGE et al., 2008; NETA et al., 2009).

A partir dos linfonodos regionais, os microrganismos podem disseminar livremente ou no interior de macrófagos, pela via hemática e linfática albergando-se em outros linfonodos, principalmente os supramamários, e em órgãos como baço, fígado e outros tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver nestes locais por longos períodos, escapando da resposta imune (HARMON et al., 1988; GORVET & MORENO, 2002; CAMPAÑA et al., 2003; LAGE et al., 2008; LIRA, 2008; MATRONE et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

O mecanismo de permanência da *Brucella* spp no interior de células de defesa está relacionado à síntese de enzimas antioxidantes e à produção de guanosina 5' monofosfato-GMP e adenina que atuam inibindo a fusão do lisossomo com o fagossomo impedindo assim a degranulação dos macrófagos durante a fagocitose e, conseqüentemente, a destruição do agente (ARESTÉGUI et al., 2001; BALDWIN & PARENT, 2002; NETA et al., 2009).

Durante a fase de multiplicação celular, estas bactérias podem provocar alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, levando à hiperplasia linfóide, esplenomegalia e até hepatomegalia (BISHOP et al., 1994; LAGE et al., 2008; MATRONE et al., 2009). Porém, de acordo com CORRÊA & CORRÊA (1992), nem todos os órgãos e tecidos invadidos por microrganismos do gênero *Brucella* apresentam alterações evidentes e áreas de necrose.

De acordo com CORRÊA & CORRÊA (1992), os órgãos e tecidos invadidos por microrganismos do gênero *Brucella* podem apresentar uma aparência normal ou áreas com necrose. A presença de *Brucella* spp em tecidos pode provocar a formação de resposta inflamatória com modulação de macrófagos em células epitelióides, infiltração por plasmócitos e linfócitos, podendo assim ocorrer focos de necrose no centro das lesões e o

desenvolvimento de cápsulas ao redor das áreas lesionadas devido à proliferação de tecido conjuntivo, porém, a formação de um granuloma depende da resistência natural do organismo, da resistência adquirida e principalmente do número e grau de patogenicidade do agente infectante.

Os órgãos de predileção do gênero *Brucella* são aqueles que oferecem elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol - álcool polihídrico de quatro carbonos - presente no útero gravídico, tecidos mamários, osteo-articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino, sendo importante ressaltar que humanos, equinos, coelhos e roedores possuem ausência ou baixa produção do eritritol, fato este que justificaria o reduzido impacto da brucelose no aparelho reprodutivo nestas espécies (CARTER & CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

A infecção do útero gestante ocorre por via hematógena e as alterações variam de acordo com a intensidade da infecção e o tempo de gestação. A afinidade das brucelas pelos trofoblastos parece estar relacionada à presença de elevadas concentrações de eritritol e progesterona na placenta (SILVA et al., 2005).

Nos bovinos, a concentração de eritritol se altera de forma gradativa conforme o período gestacional, atingindo níveis máximos próximo ao parto, aumentando assim a capacidade de infecção e multiplicação dos microrganismos (CARTER & CHENGAPPA, 1991; LAGE et al., 2008). A evolução do processo inflamatório leva a lesões necróticas-inflamatórias na placenta além de lise das vilosidades, resultando no descolamento dos cotilédones; prejuízo na circulação materno-fetal, dificultando e até mesmo impossibilitando a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando assim danos que variam de nascimento de bezerras subdesenvolvidas ao aborto (BISHOP et al., 1994; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

Devido ao desenvolvimento da imunidade celular do animal após o primeiro aborto, há uma diminuição significativa do número e tamanho das lesões nos placentomas nas gestações subsequentes. Diante disso, os abortos tornam-se infreqüentes, levando ao aparecimento de outras manifestações da enfermidade como a retenção de placenta, natimortalidade ou o nascimento de bezerras fracas, além de quadros de metrite ou endometrite crônica e conseqüentemente

subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

Os machos podem apresentar aumento do volume dos testículos de forma uni ou bilateral, além dos epidídimos, ampolas e vesículas seminais. Devido à reação inflamatória do tipo necrosante, pode haver atrofia do órgão afetado, levando a quadros de subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (GORVEL & MORENO, 2002; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; NOZAKI, 2008).

No aparelho locomotor, os microrganismos do gênero *Brucella*, principalmente a *B. abortus* localiza-se na bursa, tendões, músculos e articulações, causando artrites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas; espondilites e bursites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares, podendo atingir a medula óssea e bainha dos tendões, sendo o achado clínico clássico, o abscesso fistulado ou não na região da cernelha, lesão conhecida como “mal da cernelha” ou “mal das cruces”, que acomete principalmente os equinos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; RADOSTITIS et al., 2007).

Os inchaços nas articulações dos joelhos e jarretes, conhecidos como higromas, também apresentam evidência de brucelose (RADOSTITIS et al., 2007; LAGE et al., 2008).

VERONESI (1991) considera como lesões sugestivas de brucelose em bovinos as alterações denominadas bursites, higroma articular e orquite. As bursites cervicais são lesões inflamatórias de origem hematogênica, caracterizadas como bolsas serosas localizadas na região da cruz, adjacentes à porção funicular do ligamento cervical e apófises espinhosas cervicais.

Muitos autores associam a presença de bursite à infecção brucélica, visto a frequência de isolamento e detecção do agente em muitos casos, além da detecção de títulos de anticorpos aglutinantes compatíveis com a doença (PARDI et al., 1956; LANGENEGGER et al., 1975; JUBB et al., 1993; RIBEIRO et al., 2003; FREITAS & OLIVEIRA, 2005; PARDI et al., 2006; VIANA et al., 2010). Porém, em muitos relatos a ação parasitária principalmente pelo gênero *Onchocerca* é uma das causas que predispõe a formação das bursites cervicais não só como causa primária, mas, principalmente, como fator desencadeante de

processos inflamatórios graves por infecção secundária (ALMEIDA et al., 2000; COSTA et al., 2001).

2.5 Mecanismos de transmissão

A principal via de infecção de *Brucella* spp no organismo é a oral, além do trato respiratório, conjuntivas, pele e trato genital (ACHA & SZYFRES, 2001).

Os animais contaminados transmitem as bactérias do gênero *Brucella* através do parto ou aborto, valendo destacar que as fêmeas após abortarem pela primeira vez, tornam-se portadoras crônicas, eliminando *Brucella* spp no leite, urina e descargas uterinas durante os partos subsequentes, abortando ou não (PACHECO, 2007; MIYASHIRO, 2004). A partir da terceira gestação após a infecção, os abortos não ocorrem, devido à imunidade celular e a redução de necrose dos placentomas, permitindo assim o nascimento dos bezerros (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A enorme quantidade de microrganismos eliminados durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à ampla resistência do agente no ambiente pode ser caracterizada como a principal fonte de infecção para os animais suscetíveis. Há um favorecimento da transmissão de brucelose pelo próprio hábito dos bovinos de lambar e cheirar as crias ou fetos abortados por outros animais (NICOLLETTI, 2002; SILVA et al., 2005; 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, a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção, entretanto, cuidados especiais devem ser tomados com a inseminação artificial, visto que o sêmen é aplicado diretamente no útero, onde não existem barreiras inespecíficas, tornando-se um ambiente propício para multiplicação do agente (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

As bactérias do gênero *Brucella* também podem ser disseminadas entre os animais por fômites, destacando-se a água e alimentos contaminados (ACHA & SZYFRES, 2001).

Este gênero sobrevive no ambiente, mas não se multiplicam nele. Possui ampla capacidade de sobrevivência, porém necessita de condições como presença de sombra, umidade, baixas temperaturas e pH neutro (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006; OIE, 2009).

A introdução dos animais infectados em rebanhos sadios constitui o principal risco nas propriedades rurais, por isso o comércio de animais só deve ocorrer quando a condição sanitária seja conhecida, sendo o ideal a procedência de rebanhos livres ou então que sejam submetidos a testes de diagnóstico que garantam a sanidade do rebanho (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008)

Várias espécies domésticas ou silvestres são suscetíveis à infecção por *Brucella* spp, mas por não transmitirem o agente novamente aos bovinos, são consideradas apenas como hospedeiros finais da infecção. Os bovinos são os hospedeiros preferenciais da *B. abortus*, porém bubalinos, equinos, suínos, ovinos, caprinos e cães podem ser infectados (LAGE et al., 2008; MINHARRO, 2009).

Outras espécies de *Brucella* como *B. melitensis* e *B. suis* podem causar brucelose em bovinos devido ao convívio com cabras ou ovinos e suínos, que são respectivamente, os reservatórios naturais desses agentes (ACHA & SZYFRES, 2001; OIE, 2009).

Os cães de fazenda não são considerados como os principais reservatórios de *B. abortus*, porém podem ser responsáveis pela disseminação da doença por normalmente carregarem produtos de aborto. Além disso, o agente pode ser isolado dos cães quando na presença de bovinos infectados, devendo ser incluídos nos programas de controle e erradicação da doença (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Entre as espécies que apresentam importância na epidemiologia da brucelose bovina, podem ser citados além dos cães, os equídeos que, quando convivem com bovinos infectados, podem apresentar lesões articulares crônicas, porém, raramente abortam (RIBEIRO et al., 2003; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Na inspeção sanitária realizada em matadouros-frigoríficos, os inspetores veterinários realizam o julgamento de carcaças e vísceras de bovinos suspeitos

de brucelose mediante a observação macroscópica de lesões sugestivas da enfermidade, não dispondo de meios de diagnóstico específicos que possam associar diretamente as alterações observadas nos exames sanitários com a infecção brucélica (FREITAS & OLIVEIRA, 2005).

As bursites de cernelha de bovinos são de difícil visualização à inspeção *ante-mortem*, sendo o diagnóstico macroscópico realizado durante a inspeção *post-mortem*, por inspetores veterinários (PARDI et al., 1956; LANGENEGGER et al., 1975; ALMEIDA et al., 2000).

Devido ao caráter zoonótico que o gênero *Brucella* apresenta, o artigo 163 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952) determina que carcaças que apresentarem lesões extensas de brucelose devem ser condenadas ou destinadas a esterilização pelo calor, após remoção das áreas atingidas a fim de eliminar qualquer fonte de contaminação aos consumidores destes alimentos.

Humanos normalmente se infectam pelo contato direto do agente com mucosas ou soluções de continuidade da pele, pela manipulação de tecidos, sangue, urina, secreções vaginais, fetos abortados e envoltórios fetais provenientes de animais infectados ou pela ingestão da bactéria em alimentos, geralmente de leite cru ou derivados lácteos não pasteurizados (queijos, manteigas, iogurtes, sorvetes) além de carnes cruas, mal assadas ou cozidas, obtidas de animais infectados (BRASIL, 2006; PAULIN & FERREIRA NETO, 2008).

Os sintomas mais frequentes de brucelose são febre intermitente, dores musculares, articulares, cefaléia e sudorese, sendo geralmente confundida com gripe recorrente. Outras complicações como endocardite e problemas articulares podem ocorrer, porém com menor frequência (SILVA et al., 2005; AL DAHOUK et al., 2007).

Esta zoonose pode ser considerada uma enfermidade de caráter ocupacional, pois afeta profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição ao agente (LAGE et al., 2008; MINHARRO, 2009; OIE, 2009). A capacidade de penetração pela pele íntegra ou lesada e pelas membranas mucosas, além da formação de aerossóis, predispõe os tratadores, veterinários,

laboratoristas, trabalhadores de matadouros-frigoríficos e entrepostos de leite ao risco de infecção (LAGE et al., 2008).

LANGENEGGER et al. (1975) e PARDI et al. (2006), alertam sobre a possibilidade de contaminação em ambientes de abatedouros, visto ao risco de rompimento de bursites durante os procedimentos de manipulação, provocando extravasamento do conteúdo das bolsas mucosas e a consequente infecção dos operadores, contaminação de equipamentos e das instalações, além da formação de aerossóis. A carne não constitui importante fonte de veiculação de brucelose visto ao número reduzido do agente, porém traz riscos se estiver pouco cozida ou mal assada. A medula óssea e vísceras mal cozidas também se constituem importantes fontes de infecção humana.

A vacina B19 utilizada amplamente nos programas de controle e erradicação da brucelose é patogênica para o homem, havendo inúmeros relatos na literatura de infecções acidentais, especialmente entre veterinários e vacinadores, sendo necessária a utilização de equipamentos de proteção individual como máscara, óculos, luvas e avental de manga longa durante a vacinação (LAGE et al., 2008).

Nos laboratórios, a realização de diagnósticos diretos buscando o isolamento e identificação do agente a partir de amostras clínicas e a manipulação de massas bacterianas para a produção de vacinas e antígenos, constituem uma forma eficiente de infecção principalmente por formação de aerossóis, estando a bactéria incluída na lista de agentes biológicos com potencial bioterrorista (COSTA, 2001; MENSE et al., 2004; MINHARRO, 2009).

A transmissão entre pessoas, embora possível, é considerada insignificante sob o ponto de vista epidemiológico, porém, a literatura relata casos de transmissão por meio de transfusão de sangue, transplante de medula e até por relação sexual (GODFROID et al., 2005; MINHARRO, 2009).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Métodos Indiretos

Os métodos indiretos ou sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose constituem-se em um importante recurso utilizado nas campanhas de controle e erradicação da doença em bovinos e bubalinos (OLIVEIRA, 2003).

Os testes sorológicos detectam os anticorpos contra *Brucella* spp presentes em diversos fluidos corporais como soro sanguíneo, muco vaginal, sêmen e leite. Para se escolher um método sorológico, deve-se levar em consideração o tamanho e as características da população a ser analisada, a situação epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes e principalmente se há utilização de vacinas (POESTER et al., 2005).

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da enfermidade, destacam-se o de Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAT), Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), 2- Mercaptoetanol (2-ME), Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Fixação de Complemento (FC), Rivanol e o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (OLIVEIRA, 2003; NIELSEN et al., 2004).

O PNCEBT definiu como oficiais os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste de Anel em Leite (TAL), como provas de triagem. Já como testes confirmatórios estabeleceu o teste do 2- Mercaptoetanol (2-ME) e a reação de Fixação do Complemento (FC) para detecção de antígenos pelo emprego de anticorpos específicos, com o objetivo de detectar uma exposição prévia do animal ao agente (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos empregados para o diagnóstico da brucelose identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados, baseando-se em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (ALTON et al., 1988; RAJASHEKARA et al., 2005; MINHARRO, 2009).

De certa forma, testes sorológicos não apresentam sensibilidade absoluta, havendo a necessidade de associação entre várias técnicas em busca de melhores resultados na detecção de animais positivos, sobretudo na fase inicial da infecção e em infecções crônicas (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003).

Nestes testes podem ocorrer reações inespecíficas decorrentes do compartilhamento de epítomos com outros gêneros bacterianos ou até mesmo envolvendo imunoglobulinas da classe IgM, provenientes da vacinação contra brucelose, gerando resultados falso-positivos (ALTON et al., 1988; COSTA, 2001; MINHARRO, 2009).

Atualmente, acredita-se que os agentes como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:116 e O:157, *Bordetella bronchiseptica*, *Moraxela spp*, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana*, *Pseudomonas maltophilia*, *Staphylococcus spp*, *Campylobacter spp* e outros gêneros possam causar reações cruzadas em testes sorológicos, dificultando o diagnóstico por produzir resultados falso-positivos (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003; MINHARRO, 2009).

2.6.2 Métodos Diretos

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

Geralmente, estes métodos são utilizados após a manifestação dos sinais clínicos, momento este em que a bactéria já se encontra disseminada no rebanho, sendo importante a confirmação de focos da doença e a caracterização do agente (VEJARANO RUIBAL, 2009; MATRONE, 2009).

A bacteriologia possui alta especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e biovariedades, sendo considerada *gold standard*. No entanto, o isolamento de *Brucella spp* é um processo trabalhoso, sendo necessários dias para a identificação do agente visto a sensibilidade e as exigências com relação aos meios de cultivo, além de se constituir um patógeno de alto risco biológico, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados, instalações e equipamentos de proteção de nível 3 (POESTER et al., 2005; LAGE et al., 2008).

Classicamente, o diagnóstico direto da brucelose é realizado a partir do cultivo, isolamento e a identificação do gênero *Brucella* oriundo de material de aborto ou de secreções como leite, sêmen e líquido sinovial de articulações comprometidas (CARTER & CHENGAPPA, 1991; NIELSEN, 2004; LAGE et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009). Em casos de aborto, o material de eleição são

os anexos placentários e o conteúdo gástrico, além do baço, fígado, pulmão e rins dos fetos abortados.

Segundo PAULIN & FERREIRA NETO (2003), devem ser colhidos das carcaças de bovinos, no momento do abate, os linfonodos retrofaringeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos, mas principalmente os supramamários, onde o agente é isolado em quase 90% dos animais infectados. Entretanto, devido ao processo de replicação das brucelas e a posterior difusão através da corrente sanguínea e vasos linfáticos, há disseminação deste agente por todo o organismo, sendo possível sua identificação no fígado, baço, pulmões e rins, além dos linfonodos e trato genital (GORVEL & MORENO, 2002; CAMPAÑA et al., 2003; LIRA, 2008).

As brucelas podem ser isoladas e mantidas em meios de cultura como o ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5%, ágar Triptose e ágar *Brucella*. Durante o cultivo, a bactéria necessita de no mínimo 3 a 5 dias de incubação em um ambiente microaerófilo, com tensão de CO₂ em torno de 5 a 10%, além de temperatura média de 37°C e pH neutro 6.6 a 7.4 (MINHARRO, 2009; OIE, 2009).

Para inibir a multiplicação de contaminantes durante o isolamento, recomenda-se a utilização do meio de Farrel por conter vários antimicrobianos (ácido nalidíxico, bacitracina, ciclohexamida, nistatina, polimixina B e vancomicina) que minimizam a contaminação bacteriana secundária (CARTER & CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO et al., 2008, MINHARRO, 2009).

No ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5%, as colônias apresentam-se pequenas, translúcidas, opacas, convexas e com bordos arredondados, após quatro a cinco dias de incubação (RIBEIRO et al., 2008).

As bactérias do gênero *Brucella* são Gram negativas, porém coram-se bem por outros métodos tintoriais como Ziehl-Neelsen e Koster modificados. À microscopia óptica, se apresentam como bastonetes curtos, isolados, aos pares ou em pequenos grupos (NIELSEN et al., 2004; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

As características bioquímicas deste gênero revelam, nos testes de classificação, a utilização de carboidratos, porém sem a produção de ácido ou gás em quantidades suficientes. Algumas cepas são catalase e oxidase

positivas, não causam hemólise e muitas delas produzem urease, ácido sulfídrico e reduzem nitrato a nitritos (CARTER & CHENGAPPA, 1991, 1991; PAJUABA, 2006; RIBEIRO et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009).

A técnica de imunohistoquímica também constitui um método de diagnóstico direto, destacando pela alta praticidade e ausência da viabilidade do agente nos tecidos. Tem sido utilizada como técnica auxiliar nos estudos de patogenia e diagnósticos de enfermidades como a brucelose. Pode ser realizada a partir de materiais de aborto fixados com formol, permitindo além da identificação do agente com a especificidade das reações antígeno-anticorpo, a visualização das características das lesões examinadas (ANGREVES, 2008; MINHARRO, 2009; XAVIER et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase desenvolvida por MULLIS na década de 80 permite a detecção de um segmento específico de DNA por meio da amplificação enzimática *in vitro*, facilitando o diagnóstico direto de doenças infecciosas pela identificação do ácido nucléico do agente, além de superar as limitações relacionadas ao isolamento por métodos tradicionais de cultura de microrganismos (MULLIS & FALOONA, 1986; BAILY et al., 1992; NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

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 diferentes substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, como ocorre na cultura bacteriológica (FEKETE et al., 1992; GLYNN et al., 2006; PERRY et al., 2007; ANGREVES, 2008; SILVA JÚNIOR, 2008).

Na reação de PCR convencional, o fragmento alvo é detectado após o término da reação (end-point) por eletroforese em gel, necessitando de um ligante de DNA para obter a coloração do produto de amplificação, acarretando assim um tempo maior para a visualização dos resultados, além da possibilidade de contaminação devido à manipulação dos amplicons (MACKAY, 2004).

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica criada por MULLIS (1986) e da descoberta de fluoróforos associada à utilização da tecnologia óptica e da informática, possibilitando o monitoramento da reação a cada momento, e principalmente, revolucionando os processos de

quantificação de fragmentos de DNA e RNA (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004; DUARTE, 2006).

De acordo com RODRIGUEZ - LÁZARO et al. (2007), a técnica de PCR em Tempo Real permite o monitoramento da síntese dos fragmentos alvo no decorrer da própria reação e não apenas no final, como ocorre na técnica tradicional de PCR. Ela é capaz de monitorar a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção das amplificações em cada ciclo de PCR, gerando resultados com maior sensibilidade, precisão, velocidade nas análises, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação, já que a reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações.

A PCR em Tempo Real utilizando o sistema TaqMan[®] baseia na detecção de um sinal fluorescente emitido por uma molécula anelada à sequência de ácidos nucleicos (sonda). Para a execução da técnica, são necessários além dos iniciadores comumente utilizados na PCR convencional, de um terceiro oligonucleotídeo (sonda TaqMan[®]) com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo (molécula repórter - capaz de absorver e emitir luz em comprimentos de onda específicos) e na extremidade 3', a molécula *quencher*, capaz de absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo, por meio de um fenômeno físico denominado FRET -Transferência de energia de ressonância por fluorescência (NEWBY et al., 2003; MACKAY, 2004).

Durante a PCR em Tempo Real, a sonda hibridiza com a sequência de fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. Quando a sonda está intacta, a proximidade da molécula *quencher* com a molécula repórter leva a redução do sinal de fluorescência emitida, garantindo assim que a extremidade 3' da sonda permaneça bloqueada e não atue como um iniciador (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

No processo de amplificação, a enzima *Taq* DNA polimerase cliva a sonda devido à sua atividade exonucleásica 5'-3', separando o fluoróforo do *quencher* durante a fase de extensão. A separação destas moléculas resulta em um aumento da intensidade da fluorescência em escala exponencial e cada vez que uma nova fita dupla do DNA alvo é replicada, emite-se um sinal fluorescente que imediatamente é captado pelo equipamento e aumenta na proporção direta da

quantidade de produto da PCR (ALVAREZ et al., 2004; NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). Ele permite a quantificação exata e reprodutível da amplificação, sendo proporcional ao número de cópias do alvo presente na amostra (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004). Este ponto permite a quantificação baseada na fluorescência emitida pela sonda ao ser hibridizada durante a ação da Taq DNA-polimerase e, quanto maior a quantidade inicial do alvo, mais rapidamente o produto acumulado é detectado na reação de PCR e, conseqüentemente menor, o valor do C_t (DORAK, 2006).

Considerando a acurácia e a rapidez de execução que a PCR apresenta quando comparada ao cultivo bacteriológico, esta técnica tem se mostrado eficiente no diagnóstico direto de microrganismos, atuando como ferramenta epidemiológica na detecção de *Brucella* spp (BRICKER, 2002).

Este gênero possui o genoma amplamente conservado entre as espécies, por isso a maioria das PCRs desenvolvidas são gênero-específicas, amplificando assim sequências de DNA comuns às diferentes espécies de *Brucella* spp (HALLING et al., 2005; FOSTER et al., 2008; XAVIER, 2009).

A escolha de oligonucleotídeos para a detecção do DNA do gênero *Brucella* pela técnica de PCR baseia nos genes RNA 16S (ROMERO et al., 1995; DA COSTA et al., 1996), nos genes das proteínas da membrana externa BCSP31 (*omp* 31) (DA COSTA et al., 1996), *omp* 25 (25 kDa), *omp* 2 (36 - 40 kDa) (CLOECKAERT et al., 1995) e 43kDa (FEKETE et al., 1992), *heat shock proteins* (DA COSTA et al., 1996), no gene *bp* que codifica uma proteína antigênica BP 26 (também conhecida como OMP 28) (CLOECKAERT et al., 2001) e na sequência de inserção IS711 (BRICKER & HALLING, 1994).

Diante da grande similaridade genética entre os membros do gênero *Brucella*, torna-se interessante a utilização de oligonucleotídeos específicos baseados nas sequências de inserção IS711 que possibilitam a diferenciação entre algumas espécies do gênero (BOGDANOVICH et al., 2004; SCOTT et al., 2007; OCAMPO-SOSA & GARCÍA-LOBO, 2008; HINIC et al., 2009).

O genoma de *Brucella* spp contém a sequência de inserção (IS) chamada de IS711 ou IS6501, que é específica para o gênero. O número de cópias e a

localização genômica desta sequência difere entre as espécies, variando de 7 a 10 cópias na *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, e mais de 30 cópias na *B. ovis* e em cepas de *B. neotomae* (OUAHRANI et al., 1993; GÁNDARA et al., 2001; OCAMPO-SOSA & GARCÍA-LOBO, 2008; HINIC et al., 2009).

A escolha do gene direcionado à região codificadora de uma proteína periplasmática da membrana externa da *Brucella* spp, a proteína BP26, tem apresentado vantagens pelo fato de que ela está presente em todas as espécies de *Brucella* spp, porém encontra-se ausente na região periplasmática da *Yersinia enterocolitica*, agente frequentemente envolvido em ocorrências de reações cruzadas com *Brucella* spp nos testes de diagnóstico (ROSSETTI et al., 1996; VIEIRA, 2004).

Como alguns oligonucleotídeos amplificam, sob algumas condições, sequências de genes de bactérias muito próximas geneticamente às do gênero *Brucella*, como *Ochrobactrum anthropi* e *Phyllobacterium* spp, a escolha de iniciadores a partir do gene BP26 associada a sequência conservada IS711, tem mostrado padrões distintos entre as espécies e biovars, além de permitir maior especificidade e segurança na detecção dos patógenos (ROMERO et al., 1995; DA COSTA et al., 1996; VIEIRA, 2004; BOUNAADJA et al., 2009; XAVIER, 2009)

A detecção de *Brucella* spp por meio da técnica de PCR vem sendo empregada com sucesso em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras, como sêmen (AMIN et al., 2001; KEID et al., 2002; MANTEROLA et al., 2003), secreções vaginais (KEID et al., 2002), leite (LEALKLEVEZAS et al., 1995; HAMDY & AMIN, 2002; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000;), tecidos (ÇETINKAYA et al., 1999; CORTEZ et al., 2001; LEYLA et al., 2003), sangue (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000; NAVARRO et al., 2004), soro (ZERVA et al., 2001; DEBEAUMONT et al., 2005) e produtos lácteos (SERPE et al., 1999; MIYASHIRO et al., 2007).

BAILY et al. (1992) relataram a detecção de *Brucella abortus* e *B. melitensis* em uma reação de PCR a partir do conteúdo gástrico e órgãos de fetos abortados, obtendo um ensaio sensível e específico na diferenciação de *Brucella* de outros patógenos Gram negativos e na identificação de diferentes espécies dentro do gênero.

LEAL-KLEVEZAS et al. (1995) por meio da PCR conseguiram diferenciar com alta sensibilidade, o biótipo 1 dos outros biótipos de *B. abortus* em amostras de sangue e leite de animais infectados, demonstrando a eficiência da técnica para fluidos corpóreos.

ROMERO et al. (1995) descreveram que a alta especificidade e sensibilidade da PCR a torna uma valiosa ferramenta para diagnóstico de brucelose.

De acordo com relatos de CORTEZ et al. (2001), há uma boa concordância entre as técnicas do cultivo bacteriológico e a PCR, podendo esta ser uma ferramenta adicional para o diagnóstico direto da brucelose, principalmente em fetos bovinos abortados.

COSTA et al. (2001) ao estudarem o envolvimento de microrganismos em 63 amostras de lesões de bursites cervicais de bovinos, por meio do cultivo bacteriológico e PCR para a identificação gênero-específica de *Brucella* spp, obtiveram o isolamento de diversos gêneros bacterianos, além da detecção do DNA de *Brucella* spp em 18,33% das amostras, porém sugeriram que as formações de bursites cervicais neste estudo provavelmente não foram decorrentes da infecção brucélica.

HAMDY & AMIN (2002) observaram que a detecção de *Brucella* spp por PCR em leite infectado de bovinos, ovinos, caprinos e camelos sorologicamente positivos, apresentou maior sensibilidade do que o isolamento bacteriano, rapidez nos resultados e uma maior segurança por diminuir o risco de transmissão do agente durante a manipulação laboratorial.

RICHTZENHAIN et al. (2002) desenvolveram uma PCR multiplex para detecção de *Leptospira* spp e *Brucella* spp em amostras de fetos bovinos abortados e alcançaram sensibilidade de 100%, provavelmente pela remoção de inibidores da PCR e pelo tratamento térmico empregado na extração de DNA - lise por fervura - além da utilização dos iniciadores B4 e B5 descritos por BAILY et al. (1992)

LEYLA et al. (2003) relataram que ao detectar *Brucella* spp em amostras de conteúdo estomacal de fetos ovinos abortados pela PCR baseada no gene IS711 alcançaram sensibilidade de 97.4% e uma especificidade de 100% quando comparada ao cultivo bacteriológico.

Apesar das vantagens aparentes que os métodos moleculares baseados na identificação da *Brucella* por PCR vêm apresentando sobre os métodos tradicionais de isolamento por cultura, O' LEARY et al. (2006) ao avaliarem o método de cultivo bacteriano, e as técnicas de PCR convencional e em Tempo Real para detecção de *Brucella abortus* em amostras de sangue, leite e linfonodos de vacas naturalmente infectadas, obtiveram o isolamento de *B. abortus* apenas em amostras de leite e linfonodo, enquanto que o sangue não se mostrou ideal para a detecção deste patógeno. Além disso, os pesquisadores não evidenciaram a existência de vantagens no uso das duas técnicas de PCR sobre os métodos convencionais sorológicos e bacteriológicos.

MIYASHIRO et al. (2007) analisaram amostras de queijos clandestinos por meio do cultivo bacteriológico e PCR para *B. abortus*. Nas amostras positivas para o agente, fizeram a diferenciação entre o DNA de campo e o da estirpe vacinal B19. Embora o microrganismo não tenha sido isolado, a PCR detectou 37 amostras positivas (19,27%), e destas, 30 (81,08%) eram cepas da estirpe vacinal B19. A padronização da reação visando diferenciar cepas vacinais e de campo permitiu verificar que a vacina B19 - vacina viva atenuada - além de induzir a presença de anticorpos em fêmeas adultas, pode infectar o útero de forma persistente, levando a eliminação intermitente ou constante do agente pelo leite, constituindo risco à saúde pública.

PACHECO (2007) avaliou a excreção da estirpe vacinal B19 pelo leite e urina de 14 fêmeas bovinas de diferentes idades, provenientes de um rebanho de exploração leiteira, vacinadas na faixa etária entre 3 e 8 meses. A autora empregou neste estudo, os diagnósticos bacteriológicos, sorológicos e PCR, correlacionando-os com as fases hormonais de um ciclo reprodutivo completo. Todas as amostras positivas na PCR foram confirmadas como sendo da estirpe vacinal B19, sendo sua excreção predominantemente no momento do cio, aos 150 dias de gestação e no pós-parto imediato (30 dias), não havendo correlação com a fase hormonal. A persistência e excreção de B19 observada nas fêmeas bovinas até nove anos de idade pode evidenciar que há possibilidade de transmissão de *B. abortus* entre bovinos, além do risco potencial à saúde pública pela suscetibilidade do homem ao agente.

ANGREVES (2008) avaliou lesões de bursites cervical em bovinos abatidos no estado de Mato Grosso, com enfoque nas características macroscópicas, análise bacteriológica, testes sorológicos, além da identificação do gênero *Brucella* e amostra vacinal B19 pela reação em cadeia da polimerase. Diante da detecção do DNA de *Brucella* spp em 77,14% das 70 amostras analisadas, constatou-se a necessidade de medidas de controle sanitário nos estabelecimentos de abate, visto a significância entre a brucelose bovina e bursite cervical.

HINIC et al. (2008) desenvolveram um ensaio de PCR para a detecção rápida do gênero *Brucella* e a diferenciação entre as espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae*. O ensaio mostrou ser altamente específico com a vantagem adicional de ser apropriado para uso nas técnicas de PCR convencional e Tempo Real.

SILVA JUNIOR (2008) ao avaliar diferentes métodos de diagnóstico da brucelose bovina em amostras procedentes de frigoríficos observou que as técnicas de isolamento bacteriológico e a reação em cadeia da polimerase não foram adequadas para estes materiais, sugerindo o uso de mais de uma técnica para o diagnóstico da enfermidade.

LIRA (2008) ao estudar a patogenia da *Brucella ovis*, em carneiros infectados experimentalmente com a cepa REO 198 via conjuntival e intraprepucial, detectou a presença do agente por meio da PCR, além de alterações anatomopatológicas, em praticamente todos os tecidos, com predominância no aparelho reprodutor, em pelo menos um dos momentos avaliados.

HINIC et al. (2009) avaliaram a técnica de PCR em Tempo Real com base na inserção específica da sequência IS711 descrita em 2008. Para tanto, utilizaram amostras de sangue de 199 javalis e amostras de tecidos de 53 javalis, coletadas na Suíça. Os resultados da PCR em Tempo Real foram comparados com aqueles obtidos no isolamento bacteriano, teste sorológico de Rosa Bengala (RBT), competitiva ELISA (C-ELISA) e ELISA indireto (ELISA-I), constatando que a técnica de PCR em Tempo Real IS711 é uma ferramenta específica e sensível na detecção de *Brucella* spp em infecções de javalis, podendo ser utilizada como

ferramenta complementar nos programas de vigilância epidemiológica da enfermidade e para confirmação do diagnóstico em casos duvidosos.

Diante da necessidade de acurácia e segurança nos diagnósticos das enfermidades, os protocolos para colheita de amostras vem, a cada dia, proporcionando facilidades no transporte, armazenamento e manuseio de amostras biológicas.

Devido ao alto poder infectocontagioso das amostras clínicas, bem como os cuidados excessivos requeridos no transporte, armazenamento e manipulação das mesmas, o emprego de métodos alternativos como os cartões de celulose para o armazenamento de amostras - cartões FTA[®] - (WHATMAN, FTA[®] Technology, USA, 2007), vem ganhando destaque.

A tecnologia FTA[®] foi desenvolvida como método alternativo para colheita de DNA e estocagem de amostras de sangue em diagnóstico neonatal, sendo utilizado posteriormente em reações de PCR para análises médicas e forenses (CARDUCCI et al., 1992; VIDAL-TABOADA et al., 2006; FIGUEIRÓ, 2008).

Esta tecnologia vem proporcionando avanços nos processos de colheita, transporte, purificação e estocagem de amostras, reduzindo assim o custo e o tempo necessários para o processamento do DNA, além de facilitar a colheita de grandes quantidades de amostras (ORLANDI & LAMPEL, 2000; MAS et al., 2007; FIGUERÓ, 2008).

O cartão FTA[®] possui uma matriz fibrosa, onde se encontram agentes quelantes e desnaturantes adsorvidos, responsáveis por reter e lisar as membranas celulares e organelas, eliminando assim o poder infectocontagioso dos microrganismos, ao mesmo tempo em que libera o DNA e o imobiliza nas fibras da matriz do cartão. Aderidos a este material, estão presentes também, desnaturantes de proteínas e outros químicos responsáveis por proteger o DNA do ataque de nucleases, da oxidação e dos raios ultravioleta, permitindo a conservação do material genético por longos períodos, sob temperatura ambiente (ORLANDI & LAMPEL, 2000; GUTIÉRREZ-CORCHERO et al., 2002; NDUNGURU et al., 2005; RAJENDRAM et al., 2006; WHATMAN, 2007; OWOR et al., 2007).

Em decorrência da inativação dos microrganismos patogênicos, os cartões podem ser transportados sem qualquer risco biológico, podendo ser enviados aos

laboratórios através do serviço postal regular, sem restrições quanto à manipulação, tornando-se uma ferramenta muito útil para a coleta de amostras biológicas de campo (PURVIS et al., 2006; GLASS et al., 2009; WOLFGRAMM et al., 2009).

O protocolo de colheita e armazenamento do material biológico nos cartões FTA[®] baseia-se apenas na fixação da amostra nas áreas delimitadas do cartão e a posterior secagem do material sobre as fibras. Após um curto período de secagem da amostra fixada, uma série de lavagens sucessivas são necessárias para remover os debris celulares e outros contaminantes não aderidos (SMITH & BURGOYNE, 2004; WOLFGRAMM et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

O processo de extração inicia nos próprios cartões FTA[®], mas o restante do processo de remoção do DNA da matriz fibrosa do cartão envolve um conjunto de lavagens com reagentes exclusivos, podendo o cartão ser utilizado diretamente na reação de PCR como molde (SMITH & BURGOYNE, 2004).

Em algumas aplicações, a eluição do DNA é necessária, por isso, foi desenvolvida a tecnologia do cartão FTA[®] Elute, que permite a remoção do DNA aderido às fibras do cartão, por meio de um processo simplificado de eluição com água destilada e calor, ampliando ainda mais as vantagens da técnica (ORLANDI & LAMPEL et al., 2000; WHATMAN, 2009; FIGUEIRÓ, 2008).

Segundo BECKETT et al. (2008), as amostras armazenadas no cartão FTA[®] apresentam DNA de alta qualidade e cada amostra pode ser usada como molde para no mínimo 20 a 30 reações de PCR. Além do baixo custo dos cartões FTA[®], esta tecnologia permite a realização de diagnósticos rápidos, precisos e com aplicações em diferentes áreas da ciência como: na conservação do DNA humano (DOBBS et al., 2002), em amostras de DNA de animais selvagens (SMITH & BURGOYNE, 2004), para a caracterização molecular de vírus a partir de tecidos vegetais (NDUNGURU et al., 2005), caracterização molecular de patógenos que acometem aves (PURVIS et al., 2006), a caracterização molecular do vírus da raiva (PICARD-MEYER et al., 2007) e na colheita, armazenamento e transporte de amostras contendo o vírus da febre aftosa (MUTHUKRISHNAN et al., 2008).

Diante disso, GLASS et al. (2009) com a finalidade de avançar no diagnóstico molecular da tuberculose bovina, avaliaram a segurança biológica do

material impregnado em cartão FTA[®], pesquisando *Mycobacterium bovis* e outras micobactérias viáveis, por até 5 semanas de armazenamento. A eficiência do cartão na inativação do agente etiológico foi constatada nas concentrações 10^{-3} e 10^{-4} . Contudo, mediante dados parciais, constataram também que nos cartões impregnados com soluções mais concentradas (solução mãe) foram detectados bacilos viáveis. Entretanto, os resultados preliminares apresentaram-se promissores para armazenamento do DNA bacteriano nos cartões FTA[®] visto a eficiência na inativação do agente nas concentrações 10^{-3} e 10^{-4} do material inicial contendo células viáveis de *Mycobacterium bovis* e de outras micobactérias.

De acordo com SILVA JUNIOR (2008), a utilização de testes diagnósticos em rebanhos e, principalmente, em frigoríficos fornece dados sobre a situação epidemiológica, permitindo assim a detecção de focos de doenças e a adoção de medidas de controle. Conhecendo-se a procedência dos animais de abate, torna-se possível o acionamento e a integração dos órgãos responsáveis para que decisões sejam tomadas, por isso, a integração do serviço de fiscalização e monitoramento da Defesa Sanitária com o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pode ser considerada ponto chave para o sucesso das atividades propostas pelo PNCEBT, visto a sua atuação tanto na proteção do consumidor quanto na vigilância epidemiológica.

A inspeção sanitária de carnes realizada em estabelecimentos de abate sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal realiza atividades preventivas importantes para a saúde pública, pois ao examinar carcaças e vísceras à busca de situações anormais que condicionam ou impedem o aproveitamento do produto ou matéria prima para o consumo, afasta assim do mercado consumidor carnes impróprias que podem ser prejudiciais a saúde humana (SILVA JÚNIOR, 2008; VIANA et al., 2010.).

2.7 Controle

As estratégias de controle da brucelose têm como base a redução constante do número de focos da doença, além do controle do trânsito de animais de reprodução e a certificação de propriedades livres da enfermidade por meio do

diagnóstico, sacrifício dos animais positivos e a adoção de medidas ambientais (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A vacinação é empregada com o propósito de reduzir a prevalência da doença a baixos custos. Dentre as vacinas vivas mais utilizadas, a vacina B19 vem sendo amplamente empregada nos programas de controle da brucelose em diversos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

A vacina B19 é produzida com amostra viva atenuada da *B. abortus* bv. 1 estirpe B19. Apresenta características importantes tais como: permitir uma única vacinação em fêmeas entre três e oito meses de idade conferindo imunidade prolongada; prevenir o aborto; ser estável e não se multiplicar na presença de eritritol; ser atenuada para bovinos, causando reações mínimas após a sua aplicação, além de conferir proteção em 70-80% dos animais vacinados (NICOLETTI, 1980; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

A idade de vacinação deve ser seguida rigorosamente, pois está relacionada com a persistência de anticorpos. A vacina B19 deve ser empregada somente em fêmeas jovens com até 8 meses de idade, pois, após este período há probabilidade de uma grande produção de anticorpos que podem perdurar e interferir no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Não se recomenda a vacinação de machos ou fêmeas em gestação, devido à virulência residual que a cepa conserva, levando machos a permanecerem com títulos vacinais por longos períodos, além da possibilidade de desenvolvimento de orquite e artrites. Já em fêmeas prenhes, a vacina pode provocar o aborto, principalmente no terço final da gestação (BRASIL, 2006, LAGE et al., 2008).

Apesar dos inconvenientes que a vacina apresenta como não possuir efeito curativo e induzir a formação de anticorpos persistentes, o que reflete no diagnóstico em provas de rotina, gerando resultados falso-positivos, a resistência conferida ao rebanho pela vacina B19 reduz de forma significativa a severidade dos sinais clínicos, diminuindo a quantidade de agentes patogênicos eliminados no ambiente pelos animais infectados (NICOLETTI, 1980; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

Diante da necessidade de obter uma amostra vacinal que não provocasse a indução de anticorpos vacinais, foi desenvolvida na década de 90, a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51. Esta amostra, praticamente isenta de

cadeia O, foi obtida por passagens sucessivas da cepa 2308 de *B. abortus* em meios de cultura contendo rifampicina, originando uma mutante permanentemente rugosa, reduzindo assim, sua virulência (POESTER et al., 2005; GARCÍA-YOLDI et al., 2006; AMAKU et al., 2009).

A amostra RB51 possui características de proteção semelhantes à da B19, porém, por ser rugosa, previne a formação de anticorpos reagentes nos testes sorológicos de rotina, não interferindo portanto, no diagnóstico sorológico da enfermidade (POESTER, 2006; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Em alguns países esta vacina é empregada oficialmente nos programas de controle de brucelose, porém no Brasil, a utilização da RB51 está restrita a vacinação estratégica de fêmeas adultas (BRASIL, 2006).

Os programas de controle e erradicação de uma enfermidade são estruturados principalmente na interrupção da cadeia de transmissão do agente através da eliminação de indivíduos infectados e no aumento do número de indivíduos resistentes na população. A vacinação constitui uma poderosa estratégia de controle, principalmente quando empregada de forma ampla com a utilização da vacina B19 em fêmeas jovens e a vacinação estratégica com RB51 em fêmeas com idade superior a oito meses. Desta forma, aumenta a cobertura vacinal e, conseqüentemente, diminui a porcentagem de indivíduos suscetíveis, a taxa de abortos e a taxa de infecção (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Com a redução da prevalência a níveis aceitáveis, a vacinação em massa se torna desnecessária e as estratégias de controle são alteradas para medidas de erradicação, cujo objetivo consiste na eliminação de todos os focos. A identificação destes focos tem como base a detecção de anticorpos no leite; a aplicação de testes sorológicos em animais de reprodução sob trânsito e animais de reprodução descartados em abatedouros; a busca por produtores informais; a investigação de propriedades que apresentam relação epidemiológica com focos; a investigação de abortos bovinos e, principalmente, casos de brucelose humana (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Empregar a técnica de PCR em Tempo Real para a detecção de DNA de *Brucella* spp em fluidos e tecidos de carcaças e vísceras de bovinos com suspeita de brucelose, provenientes de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal, no estado de Goiás.

3.2 Específicos

- Aplicar a técnica de PCR em Tempo Real na detecção do DNA de *Brucella* spp em fluidos e tecidos de carcaças e vísceras de bovinos com lesões sugestivas de brucelose, provenientes de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal no estado de Goiás, utilizando na colheita de amostras, cartões de celulose para armazenamento de material biológico - cartões FTA[®] Elute;
- Determinar a frequência de DNA de *Brucella* spp em lesões macroscópicas sugestivas da enfermidade;
- Avaliar a segurança e rapidez da técnica de PCR em Tempo Real na detecção de DNA de *Brucella* spp, com vistas a auxiliar em tempo hábil de 24-48 horas, os médicos veterinários inspetores no critério de julgamento de carcaças e vísceras dos animais de abate com brucelose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a outubro de 2010 foram analisadas 47 amostras de tecido animal, colhidas em carcaças e vísceras de 40 bovinos com suspeita de brucelose, abatidos em matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizados no estado de Goiás.

4.1 Definição de amostra

Foram consideradas amostras, as alterações macroscópicas sugestivas de brucelose em carcaças e vísceras de animais abatidos em estabelecimentos sob Inspeção Federal no estado de Goiás.

Na colheita de amostras, admitiu-se a tendência de localização das infecções brucélicas e definiu-se as principais alterações anatomopatológicas como alvo. Assim, colheu-se material de lesões articulares diagnosticadas como bursites cervicais, alterações inflamatórias nos testículos, prepúcio, fígado, pulmões e linfonodos: mandibular, retrofaríngeo, esofageano, intercostal, apical, mediastínico, traqueobrônquico, inguinal, isquiático, poplíteo e mesentérico.

4.2 Diagnóstico de brucelose em estabelecimentos de abate

O diagnóstico de brucelose foi realizado durante a inspeção sanitária *ante-mortem* dos animais, pela observação de sinais clínicos da doença, pelos dados epidemiológicos do rebanho e no interior da sala de matança dos matadouros-frigoríficos, no momento da inspeção sanitária de rotina, ou seja, na inspeção *post-mortem*.

4.3 Colheita de amostras

Após serem detectadas pelos agentes de inspeção sanitária nas linhas de inspeção, as carcaças e vísceras com lesões sugestivas de brucelose, foram desviadas do seu fluxo normal e encaminhadas ao Departamento de Inspeção Final (DIF). Neste local, os médicos veterinários inspetores, Fiscais Federais

Agropecuários, examinaram visualmente todas as lesões, com vistas à similaridade com aquelas sugestivas da doença.

Nos casos suspeitos, foram realizadas as colheitas das amostras utilizando o cartão de celulose FTA[®] Elute (WHATMAN, FTA[®] Elute Technnology Inc., USA, 2009) para armazenamento do material. As amostras foram colhidas e transferidas para os cartões com o auxílio de um swab. Após a fixação do material na matriz fibrosa, todos os cartões foram identificados com dados relativos às características das lesões macroscópicas e em seguida, foram preenchidos formulários para solicitação de análises, contendo informações como data e pontos de colheita de amostras e a identificação dos animais suspeitos, como lote e carcaça, Figura 10, em anexo.

Uma vez colhidas, as amostras foram mantidas por cerca de uma hora a temperatura ambiente para a secagem do cartão. Em seguida foram armazenadas em sacos plásticos esterilizados e encaminhadas juntamente com as solicitações de envio de amostras, via correio, ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LBM/CPA/EVZ/UFG), localizado na cidade de Goiânia - GO.

Dados relativos à idade cronológica, sexo e procedência dos animais suspeitos foram levantados nos estabelecimentos de abate e nos registros oficiais do Serviço de Inspeção Federal e encaminhados ao LBM/CPA/EVZ/UFG, juntamente com as solicitações de análise e os cartões contendo as amostras colhidas. Em alguns casos, foram encaminhadas fotografias dos casos sugestivos, contribuindo com a identificação das amostras.

4.4 Detecção de DNA do gênero *Brucella* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real

4.4.1 Eluição do DNA genômico

As amostras armazenadas nos cartões FTA[®] Elute foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante (WHATMAN, FTA[®] Elute Technnology, USA, 2009).

Em cada cartão FTA[®] Elute podem ser colhidas até quatro amostras, sendo uma por círculo. Para a eluição do DNA, foi retirado de cada círculo do cartão, um disco de 3 mm de diâmetro com o auxílio do cortador *Harris Uni-Core™ Micro-Punch*, sendo transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL.

Cada disco de papel foi lavado com 500 µL de água Mili-Q esterilizada por meio de homogeneização em Vórtex por 3 vezes durante 5 segundos, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 5 segundos. Após a remoção da água, com o auxílio de pipeta automática, adicionou-se ao tubo de polipropileno, 30 µL de água Mili-Q esterilizada, realizando-se a incubação a 95°C por 30 minutos e posterior centrifugação a 10.000 rpm por 5 segundos, obtendo-se o DNA em suspensão.

4.4.2 Quantificação do DNA

Após a eluição do DNA contido nos cartões FTA[®] Elute, uma alíquota de 1 µL do DNA eluído de cada amostra foi submetida à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 e 280nm em equipamento Nanophotometer (IMPLEN[®], 2008) a fim de avaliar a integridade e a determinação da concentração do DNA.

As amostras que apresentaram concentração de DNA acima de 20ng/µL, foram submetidas à diluição com solução T.E. (10mM Tris, 1mM EDTA; pH= 8,0) considerando-se a fórmula $C \cdot V = C_1 \cdot V_1$, onde:

C = é a concentração do DNA obtida na quantificação;

V = é o volume inicial do DNA concentrado (30 µL) menos o volume pipetado para a aferição (1µL) correspondendo a um total 29µL;

C1 = é a concentração de trabalho correspondente a 20ng/µL;

V1 = é o volume final, sendo que o volume da solução T.E. a ser adicionado equivale à fórmula (V1- V).

4.4.3 PCR em Tempo real

Na reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo real empregado na detecção do DNA de *Brucella* spp em amostras de tecido animal de bovinos suspeitos de brucelose, foram utilizados iniciadores previamente sintetizados e

avaliados pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LBM/CPA/EV/UFG).

Os iniciadores e sonda utilizados na detecção do DNA do gênero *Brucella* foram desenhados utilizando a sequência de referência do gene *Brucella* spp B2/94 Bp26 (bp26) e a sequência de inserção IS711 (número de acesso no GenBank [AF242532.1](#)) (QUADRO 1).

QUADRO 1- Sequências de iniciadores e sonda utilizadas para amplificação do DNA de *Brucella* spp pela reação em cadeia da polimerase em Tempo real

PCR	Sequências dos iniciadores e sonda			Fragmento Alvo (pb)
	Primer senso (5' → 3')	Sonda (5' → 3')	Primer anti-senso (3' → 5')	
Bp26 gene B2/94	gaagcttgccgacagtcacc	FAM-cgaccaagctgcatgctgtgtc-TAMRA	cgctcgcggtggattg	110

A sensibilidade analítica foi avaliada previamente por meio da realização de diluições decimais seriadas e sucessivas do DNA da *B. abortus* bv.1 estirpe vacinal B19, a partir da diluição 10⁰. Foram preparadas 30 diluições que submetidas à PCR em Tempo Real, revelaram amplificação em todas elas, demonstrando 100% de sensibilidade dos iniciadores utilizados na reação.

A especificidade analítica da reação foi avaliada utilizando-se DNA de vários microrganismos, muitos deles associados à infecção em bovinos, além do DNA humano e de algumas espécies animais, não sendo observado qualquer sinal específico. Amostras de DNA de *B. abortus* 544 (bv.1), *B. abortus* bv. 3, *B. ovis* 63/290, *B. melitensis* 16 M (bv.1), *B. abortus* bv. 1 estirpe vacinal B19 e cepa RB51 também foram testadas, comprovando-se a especificidade dos iniciadores com 100% de positividade (QUADRO 2).

Para a amplificação dos fragmentos alvo, foram utilizadas os seguintes componentes: 4,6 µL de água Mili-Q esterilizada, 10 µL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µL de cada iniciador (concentração final 0,9 µmols), 0,4 µL da sonda TaqMan[®] (concentração final 0,25 µmols), 2 µL

de 10X IPC Mix, 0,4 µL de 50X IPC DNA e 2 µL de template, totalizando um volume final de 20 µL.

QUADRO 2 - Distribuição das estirpes bacterianas e amostras diversas utilizadas como controles no teste de especificidade dos iniciadores

1 - <i>Escherichia coli</i>	24- <i>Prototheca blaschkeae</i>
2 - <i>Clostridium perfringens</i>	25 - <i>Salmonella choleraesuis</i>
3 - <i>Clostridium estertheticum</i>	26 - Sangue bovino
4 - <i>Enterobacter aerogenes</i>	27 - Sangue de ave
5 - <i>Enterobacter cloacae</i>	28 - Sangue caprino
6 - <i>Staphylococcus aureus</i>	29 - Sangue ovino
7 - <i>Enterococcus faecalis</i>	30- Sangue humano
8 - <i>Salmonella</i> Enteritidis	31- Sangue equino
9 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32- Complexo <i>M. tuberculosis</i>
10 - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	33- <i>Mycobacterium avium</i>
11 - <i>Listeria monocytogenes</i>	34- <i>Mycobacterium intracellulare</i>
12 - <i>Listeria innocua</i>	35- <i>Mycobacterium fortuitum</i>
13 - <i>Lactobacillus acidophilus</i>	36- <i>Mycobacterium bovis</i>
14 - <i>Streptococcus pyogenes</i>	37- Vírus da Leucose Enzoótica Bovina
15 - <i>Salmonella</i> Typhimurium	38- <i>Cysticercus bovis</i>
16 - <i>Campylobacter jejuni</i>	39- <i>Cysticercus cellulosae</i>
17 - <i>E. coli</i> O157:H7	40- <i>Clostridium gasigenes</i>
18 - <i>Bacillus subtilis</i>	41- <i>B. abortus</i> 544 (bv.1)
19 - <i>Bacillus cereus</i>	42- <i>B. abortus</i> (bv.3)
20 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43- <i>B. ovis</i> 63/290
21 - <i>Prototheca zopfii</i> 61	44- <i>B. melitensis</i> 16 M (bv.1)
22- <i>Prototheca wickerhamii</i>	45- <i>B. abortus</i> bv. 1 estirpe vacinal B19
23- <i>Prototheca zopfii</i> 62	46- Cepa vacinal RB51

As condições de amplificação do fragmento alvo estão descritas no QUADRO 3:

QUADRO 3 - Condições de amplificação do DNA por meio da reação de PCR em Tempo Real

Etapas		Tempo
Pré-PCR/Pós-PCR		60°C por 30 seg.
Desnaturação inicial		95°C por 10 min.
40 ciclos	Desnaturação	95° C por 15 seg.
	Anelamento	58°C por 1 min.

Os dados de amplificação foram obtidos e analisados por meio do equipamento “Step One Plus - Real Time PCR System” da Applied Biosystem, USA. Após o término da análise, o gráfico emitido pelo *software* (FIGURA 01) em conjunto com os seus respectivos dados foram analisados e comparados com um controle positivo interno da reação (IPC – *Internal Positive Control*). A inclusão do IPC nas reações, além de confirmar o rendimento de todos os reagentes, previne a ocorrência de resultados falsos negativos decorrentes da possível presença de substâncias inibidoras da PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, USA, 2008) (FIGURA 1).

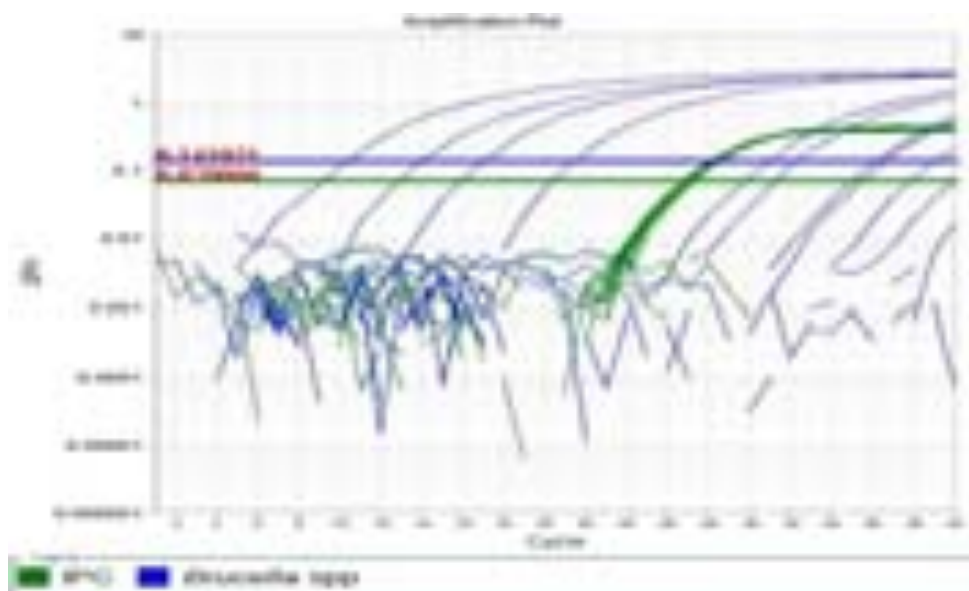


FIGURA 1 - Representação das curvas de amplificação do DNA de *Brucella* spp e do controle positivo interno (IPC) em amostras de lesões sugestivas de brucelose

Além do controle positivo interno, cada ensaio foi realizado com controles positivos da reação sendo empregados para este fim:

- Cepas ATCC (*American Type of Culture Collection*): *B. abortus* 544 (bv.1), *B. abortus* (bv. 3), *B. ovis* 63/290 e *B. melitensis* 16 M (bv. 1), que também foram utilizadas na confirmação da especificidade dos iniciadores e sonda;

- Estirpe vacinal B19: utilizada na determinação da sensibilidade analítica da reação de PCR em Tempo Real, no controle positivo das reações e na confirmação da especificidade dos iniciadores e sonda.

- Estirpe vacinal RB51: utilizada na confirmação da especificidade dos iniciadores e sonda, além de controle positivo nas reações de PCR em Tempo Real.

4.5 Análise estatística

Empregou-se a estatística descritiva com a organização e apresentação dos dados por meio de tabelas e quadros (distribuição de frequências e porcentagens para variáveis qualitativas). Na estatística inferencial foi utilizado o programa SPSS versão 15.0 for Windows, para análise dos dados, sendo empregados os testes Exato de Fisher, a fim de comparar as variáveis qualitativas através da frequência e de Regressão Logística, para avaliar se os valores da variável independente contribuem de forma significativa ou não, e estimar o risco que a variável independente representa para a incidência de falhas nesse experimento (OR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção do DNA de *Brucella* spp por meio da técnica de PCR em Tempo Real

Quanto à presença do DNA de *Brucella* spp nos animais suspeitos de brucelose durante a inspeção sanitária de rotina, detectou-se por meio da técnica de PCR em Tempo Real, 17 animais positivos (42,5%) e 23 negativos (57,5%) (FIGURA 2).

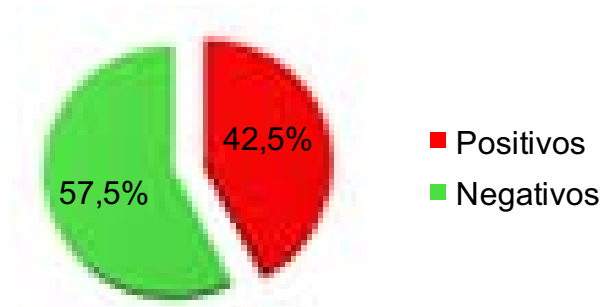


FIGURA 2- Frequência de detecção do DNA de *Brucella* spp em animais com suspeita de brucelose por meio da técnica de PCR em Tempo Real

Em relação à presença de DNA do gênero *Brucella* em lesões sugestivas da enfermidade e oriundas de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal, a reação em cadeia da polimerase em Tempo Real, realizada em 47 amostras, detectou 18 positivas (38,3%) para DNA de *Brucella* spp e 29 negativas (61,7%) (FIGURA 3).



FIGURA 3- Frequência de detecção do DNA de *Brucella* spp em lesões sugestivas por meio da técnica de PCR em Tempo Real

Diante disso, apesar da frequência positiva de 38,3% para a detecção do DNA do agente, pode-se sugerir que a origem das lesões sugestivas provavelmente não foi decorrente de infecção brucélica, mas de outras patologias, tais como nematódeos, principalmente de *Onchocerca* spp, além da instalação secundária de outros agentes microbianos. De acordo com COSTA et al., (2001), a presença de microrganismos na carne pode trazer riscos potenciais à saúde dos consumidores, além de prejuízos econômicos devido ao critério de julgamento adotado para esses casos: aproveitamento condicional das carcaças.

Porém, ao analisar as lesões detectadas nos estabelecimentos de abate e nominá-las conforme a maior tendência de detecção do agente pode-se afirmar que, as lesões de bursite cervical e as alterações no aparelho genital masculino (testículo e prepúcio) são características da enfermidade.

Já as alterações hepáticas, pulmonares e de linfonodos, por apresentarem menor frequência de detecção do agente, podem ser consideradas como lesões não características. Deste modo, ao relacionar a positividade e a negatividade dos resultados da PCR em Tempo Real em função da denominação das amostras em características ou não, obteve-se diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis ($p < 0,05$), verificando a maior frequência na detecção do DNA do gênero *Brucella* em amostras características (70,6%), corroborando os relatos de OLIVEIRA (2003), ANGREVES (2008) e MINHARRO (2009) que também consideraram as lesões de bursite cervical e orquite como lesões sugestivas de brucelose (FIGURA 4).

No que se refere às frequências de detecção do agente em lesões não características, esperava-se que a negatividade nos resultados da PCR em Tempo Real fosse maior. Porém, o percentual de positividade para a detecção de DNA de *Brucella* spp de 29,4% reveste-se de grande importância, visto o caráter zoonótico do agente. Esse resultado reflete a presença de um diagnóstico diferencial entre as alterações macroscópicas inespecíficas detectadas durante a inspeção sanitária de rotina nos estabelecimentos de abate.

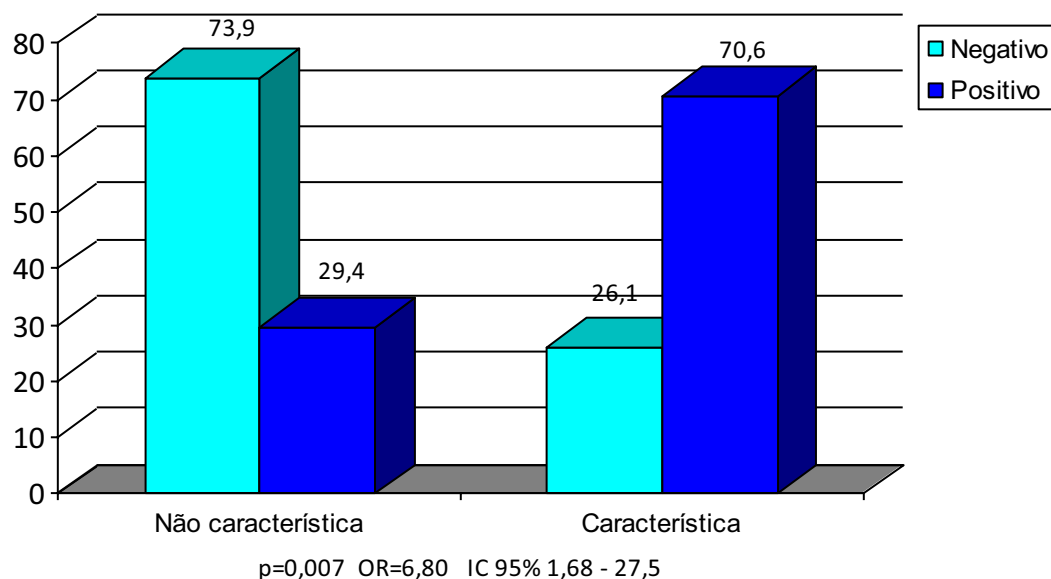


FIGURA 4- Frequências de detecção de DNA do gênero *Brucella* de acordo com lesões macroscópicas colhidas em carcaças e vísceras de bovinos

Paralelamente, avaliando a Odds Ratio (OR=6,8%) entre a detecção do DNA de *Brucella* spp e os tipos de lesões detectadas em bovinos com suspeita de brucelose, verifica-se que os dois tipos de lesões - características ou não características - de brucelose, contribuem de forma significativa para a obtenção do diagnóstico da enfermidade, tornando-se imperativo o emprego de técnicas precisas, seguras e rápidas na detecção do patógeno, a fim de auxiliar os médicos veterinários no critério de julgamento de carcaças e vísceras dos animais abatidos para consumo.

5.2 Lesões macroscópicas sugestivas de brucelose

Na Tabela 1 podem ser visualizados os locais das 47 lesões macroscópicas sugestivas de brucelose de 40 bovinos, detectadas pelo Serviço de Inspeção Federal, bem como as frequências de detecção de DNA do gênero *Brucella* no período de janeiro a outubro de 2010.

TABELA 1- Frequência de detecção de DNA de *Brucella* spp por PCR em Tempo Real em lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal do estado de Goiás, no período de janeiro a outubro de 2010, Goiânia-GO, 2011

Lesões	Positivas	Negativas	Total
bursite cervical	9/15	6/15	15
testículo	2/3	1/3	3
prepúcio	1/1	-	1
fígado	1/1	-	1
pulmão	1/1	-	1
linfonodo apical	-	2/2	2
linfonodo esofageano	-	2/2	2
linfonodo inguinal	1/2	1/2	2
linfonodo intercostal	-	1/1	1
linfonodo isquiático	-	3/3	3
linfonodo mandibular	1/1	-	1
linfonodo mediastínico	1/5	4/5	5
linfonodo mesentérico	-	1/1	1
linfonodo poplíteo	-	1/1	1
linfonodo retrofaríngeo	1/7	6/7	7
linfonodo traqueobrônquico	-	1/1	1
TOTAL	18	29	47

Das amostras encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal, as lesões diagnosticadas como bursite cervical apresentaram maior frequência de detecção de DNA de *Brucella* spp (60%) (FIGURAS 5 e 6). Esse resultado encontra-se em acordo com o relato de MINHARRO (2008). Segundo a autora, as lesões de ligamento cervical denominadas bursites cervicais, por apresentarem alta frequência de detecção de *B. abortus* são consideradas como sugestivas da infecção. Encontra também grande ressonância na afirmação de JUBB et al. (1993), pois de acordo com esses autores, como as bolsas serosas e bainhas sinoviais apresentam pouca vascularização, são consideradas locais de baixa resistência orgânica, constituindo-se assim um ambiente favorável à multiplicação de microrganismos, principalmente do gênero *Brucella*, devido às qualidades nutritivas e baixo número de leucócitos presentes no líquido sinovial.



FIGURA 5 - Lesão positiva para DNA de *Brucella* spp: bursite cervical em bovino, macho, acima de 4 anos

FONTE: Silva (2010)



FIGURA 6 - Lesão positiva para DNA de *Brucella* spp: bursite cervical em bovino, macho, com até 3 anos

FONTE: Silva (2010)

Por outro lado, ALMEIDA et al. (2000) ao analisarem 30 amostras de bursite cervical por meio de provas sorológicas para a detecção de aglutininas antibrucela, constataram que apenas 13,3% (4/30) foram positivas, não havendo associação entre o diagnóstico sorológico e bursite cervical, sugerindo que a maioria das patologias observadas não apresentavam origem brucélica.

Sabe-se, no entanto que, os métodos indiretos utilizados para diagnóstico de brucelose oferecem vantagens quanto a sensibilidade e rapidez na execução, porém uma menor especificidade, podendo proporcionar resultados falso-negativos, visto que a resposta de anticorpos é dependente do estágio de infecção durante a colheita de sangue, fato este que pode explicar a ausência de correlação entre a lesão sugestiva e o diagnóstico da enfermidade (LEAL-KLEVEZAS et al., 2000).

Mas, COSTA et al. (2001) analisaram 63 amostras de bursite cervical de bovinos pelos métodos de cultivo bacteriológico, sorologia e PCR convencional, e verificaram a presença de diversos gêneros bacterianos, de soros positivos para brucelose por meio da técnica de soroaglutinação rápida em placa, além da amplificação do DNA de *Brucella* spp em 18,33% (11/60) das amostras. Assim, os autores concluíram que a formação das bursites cervicais provavelmente não era decorrente da infecção pelo gênero *Brucella* e incriminaram a presença de nematóides, principalmente a *Onchocerca* spp como causa primária ou principal fator desencadeante dos processos inflamatórios (FIGURA 7).



FIGURA 7 - Ausência de DNA de *Brucella* spp em lesão de bursite cervical: bovino, fêmea, com até 3 anos de idade

FONTE: Silva (2010)

Porém, vale destacar que ANGREVES (2008) empregando a técnica de PCR convencional observou a presença do DNA de *Brucella spp* em 77,14% das 70 amostras de bursite cervical de bovinos. Esse resultado assemelha-se ao obtido no presente estudo, em relação à amostra analisada - bursite cervical - e a frequência de detecção do agente (60%). No que pese a semelhança entre as duas técnicas, a PCR em Tempo Real permite o acompanhamento da síntese de produtos de amplificação no decorrer da própria reação e não apenas ao final, como ocorre na PCR convencional. Permite também monitorar a fluorescência emitida durante a reação em cada ciclo de amplificação, gerando resultados com maior sensibilidade, precisão, rapidez nas análises, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação, já que a reação ocorre em sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações.

Relativamente à presença de DNA de *Brucella spp* em linfonodos, pulmão, fígado, testículo e prepúcio, LIRA (2008), também reportou a presença do agente nos linfonodos mediastínicos e nos pulmões, sugerindo a possibilidade de infecção via respiratória, devido a contaminação dos animais a partir de outros animais infectados que se encontram eliminando o microrganismo pela urina. A identificação do agente no linfonodo mandibular e retrofaríngeo tem forte relação com a contaminação por via oral, considerada a via mais comum de infecção nos animais (FIGURA 8).

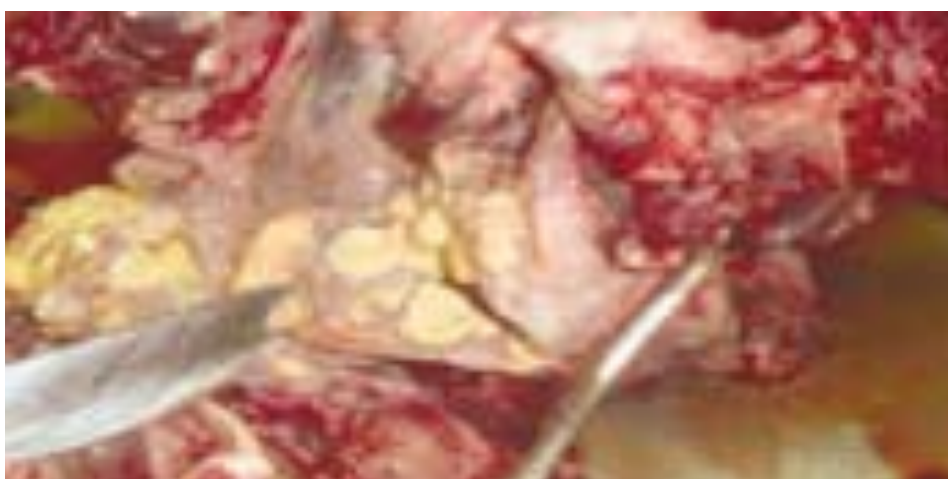


FIGURA 8 - Presença de DNA de *Brucella spp* em alteração inflamatória no linfonodo retrofaríngeo de bovino, macho, acima de 4 anos

FONTE: Silva (2010)

Outra hipótese importante relatada por LIRA (2008) refere-se à ausência de alterações visíveis em diversos órgãos e em diversos períodos, contrastando com a presença do DNA do agente pela PCR, demonstrando assim que a ausência de alterações visíveis não exclui a possibilidade do animal apresentar brucelose e ser uma fonte de infecção.

CAMPOS et al. (2009) pesquisaram as alterações microscópicas em linfonodos cervicais de bovinos sorologicamente positivos para brucelose e consideraram a reação inflamatória como lesão característica para o diagnóstico histopatológico da enfermidade. No exame *ante-mortem* desses animais, não foi observado nenhum sinal clínico que evidenciasse a doença. Do mesmo modo, na inspeção *post-mortem* não foi evidenciada nenhuma alteração nas carcaças, nem nas vísceras da cavidade abdominal e torácica, bem como nos linfonodos. Entretanto, ao serem encaminhados ao laboratório de patologia, o exame macroscópico revelou que 100% dos linfonodos cervicais apresentavam-se reacionais e, no diagnóstico histopatológico, alterações de linfadenite crônica, porém com intensidade variada, alteração compatível com o quadro de brucelose.

Diante do exposto, fica evidente que a ausência de alterações macroscópicas em carcaças e vísceras, no momento da inspeção *post-mortem* no decorrer do abate sanitário, não exclui a possibilidade do animal apresentar brucelose e constituir uma importante fonte de infecção, enfatizando assim a necessidade do monitoramento das enfermidades infectocontagiosas, do diagnóstico rápido e do destino correto das carcaças e vísceras dos animais de abate (LIRA, 2008; CAMPOS et al., 2009).

5.2.1 Resultados divergentes quanto à presença do DNA de *Brucella* spp

Torna-se imperativo destacar que foram analisadas neste estudo amostras de 40 animais, porém de 5, foram encaminhadas mais de uma amostra, dentre estes, 2 apresentaram resultados divergentes quanto à presença do DNA de *Brucella*. Assim, foram contabilizados apenas os casos positivos dos referidos animais (QUADRO 4).

QUADRO 4 –Dados relativos aos 5 animais que apresentaram mais de uma lesão sugestiva de brucelose e resultados da detecção do DNA de *Brucella* spp nas amostras encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal

Animal	Sexo	Idade	Lesões	Resultados
A	macho	Até 3 anos	testículo prepúcio	positivo positivo
B	macho	Até 3 anos	bursite cervical linfonodo mediastínico	negativo positivo
C	macho	Até 3 anos	linfonodo traqueobrônquico linfonodo esofageano linfonodo apical	negativo negativo negativo
D	macho	acima de 4 anos	linfonodo isquiático linfonodo poplíteo	negativo negativo
E	fêmea	acima de 4 anos	linfonodo mediastínico linfonodo apical fígado	negativo negativo positivo

Os animais identificados como B e E apresentaram resultados divergentes quanto à detecção do DNA do agente. No animal B, a ausência do DNA de *Brucella* spp em lesões de bursite cervical pode ser atribuída à destruição do material genético do agente no local, provocada pelo sistema imune na tentativa de destruição do patógeno ou a lesão teria sido causada por outro microrganismo, pois de acordo com COSTA et al., (2001), as lesões caracterizadas como bursites podem ser decorrentes da presença de nematóides como a *Onchocerca* spp que desencadeiam processos inflamatórios ligamentares e periligamentares nas bainhas sinoviais e bolsas serosas do ligamento nugal, predispondo à instalação secundária de outros agentes bacterianos.

No caso da fêmea identificada como E (QUADRO 4), foi detectado o DNA de *Brucella* spp apenas no fígado, corroborando com o relato de LIRA (2008). Segundo a autora, após a invasão, as brucelas são fagocitadas pelos macrófagos, se multiplicam nos linfonodos regionais, atingem a corrente sanguínea disseminando-se para diversos órgãos como fígado, baço e linfonodos, porém em muitos permanecem de forma temporária, apresentando resultados antagônicos

quando analisados em diferentes períodos. Desta forma, a não identificação do agente nos órgãos genitais e glândulas acessórias sexuais, sustenta a relação de migração e passagens transitórias do agente pelos tecidos, como observado neste estudo.

5.3 Caracterização dos animais avaliados

5.3.1 Quanto à procedência dos animais de abate

Analisando os dados relativos à distribuição dos animais abatidos para consumo nos matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal, observa-se que os mesmos originaram de vários municípios do estado de Goiás, apresentando uma distribuição variável entre as mesorregiões (TABELA 2), (FIGURA 9) e (TABELA 6 - em anexo).

TABELA 2- Distribuição de frequência dos animais avaliados, segundo as mesorregiões do estado de Goiás, Goiânia, 2011

Procedência	Animais	%
Norte	2	5,0
Noroeste	7	17,5
Leste	5	12,5
Centro	12	30,0
Sul	14	35,0
Total	40	100,0

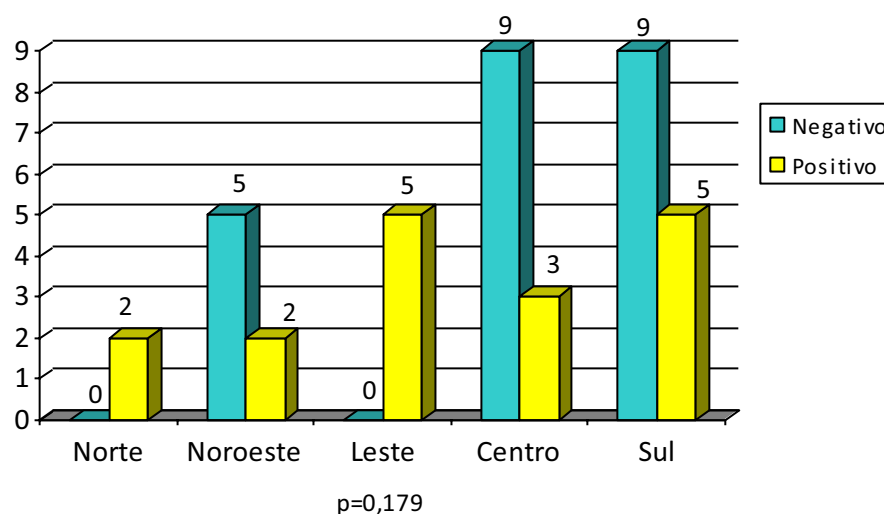


FIGURA 9 - Frequências de detecção de DNA de *Brucella* spp quanto à procedência dos animais de abate

Ainda em relação à Tabela 2 e Figura 9, verifica-se que, quando se analisa a variável procedência como fator de risco associada à condição de foco, segundo o teste de análise de regressão logística, não há diferença significativa entre a detecção do DNA de *Brucella* spp e a procedência dos animais segundo as mesorregiões do estado de Goiás ($p > 0,05$).

Esse achado encontra respaldo em ROCHA et al. (2009) que ao avaliarem a situação soroepidemiológica da brucelose do estado de Goiás, constataram que a prevalência da doença foi de 3% para os animais e 17% para focos. Ao estratificarem o estado em três circuitos produtores - corte, leite e misto - observaram que no circuito 1 (pecuária de corte), que abrange as regiões norte e nordeste, a prevalência foi de 1,4% para os animais e 7,7% para focos. O circuito 2, exploração leiteira, compreendendo as regiões sul e sudeste, apresentou prevalência em torno de 2,6% e 19,5% para focos de brucelose. Já o circuito 3 de aptidão mista - corte e leite- que compreende as regiões do sudoeste e centro do estado, apresentou a maior prevalência quanto à detecção de animais sorologicamente positivos 4,3% e 21% para focos. As prevalências de focos de brucelose e animais positivos, não apresentaram diferenças significativas nos diferentes circuitos, embora haja uma tendência para valores mais elevados nos circuitos produtores 2 e 3 e principalmente em propriedades de corte.

5.3.2 Quanto ao sexo

Na Tabela 3 estão contidos os resultados das frequências de detecção de DNA de *Brucella* spp, em função do sexo dos 40 animais analisados, sendo 36 machos e 4 fêmeas. Pode-se notar que a maior frequência de ocorrência de amostras positivas – desconsiderando o número de animais abatidos de ambos os sexos- ocorreu entre os machos, com 82,4% de positividade contra apenas 17,6% das fêmeas, porém sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

TABELA 3 - Frequência de detecção do DNA de *Brucella* spp em função do sexo, Goiânia-GO, 2011

PCR	Negativo	%	Positivo	%	p
Sexo					
Macho	22	95,7	14	82,4	0,294
Fêmea	1	4,3	3	17,6	
Total	23	100,0	17	100,0	

p= significância estatística

Teste Exato de Fisher

No tocante à relação entre machos e fêmeas, os dados obtidos neste estudo diferem dos relatados por ALMEIDA et al. (2000), FREITAS & OLIVEIRA (2005) e ANGREVES (2008) que reportaram a maior suscetibilidade das fêmeas às infecções brucélicas. Mas, vale destacar que não foi considerado neste estudo o mesmo número de animais abatidos de ambos os sexos. Se assim fosse, os resultados poderiam ser bem diferentes.

Segundo dados do IBGE (2010), houve uma redução significativa no abate de vacas, visto a retenção de matrizes por parte dos pecuaristas, após o aumento contínuo no abate de fêmeas observado no período de 2003 a 2006. Segundo o Instituto, desde o ano de 2007, a participação do abate de machos em relação ao abate total de bovinos (adultos e jovens) tem sido crescente e acima de 50%. Diante da maior quantidade de machos sendo abatidos, aumentou assim a possibilidade de identificação de lesões sugestivas nos animais no momento da inspeção sanitária no abate, ampliando as chances de detecção do DNA do gênero *Brucella* em machos, como visto neste estudo.

Torna-se relevante destacar que, de acordo PAULIN & FERREIRA NETO (2003), as fêmeas bovinas possuem maior importância na transmissão e na manutenção da brucelose, porém tanto os machos quanto as fêmeas são suscetíveis a doença. As fêmeas adultas infectadas eliminam grande quantidade de microrganismos do gênero *Brucella* no ambiente no momento do parto ou aborto e também durante o puerpério, constituindo-se nas principais responsáveis pela propagação da enfermidade entre os animais. Por isso, o alvo dos programas de controle e erradicação da brucelose se baseia na vacinação de fêmeas entre

três e oito meses de idade, como um protetor contra a doença (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; AMAKU et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009)

5.3.3 Quanto à idade

Relativamente à distribuição dos casos sugestivos de brucelose em função da faixa etária, verifica-se que a frequência de ocorrência de DNA de *Brucella* spp foi de 58,8% em animais com até 3 anos, porém ao analisarmos as frequências entre as faixas etárias, não se encontra diferenças significativas ($p > 0,05$) (TABELA 4). De acordo com relatos de ANGREVES (2008), a maior frequência de animais positivos esteve entre as fêmeas com média de idade de 48 meses. Indubitavelmente, a divergência relativa quanto à faixa etária dos animais positivos está relacionada ao sexo dos animais, visto que as fêmeas destinadas ao abate, na maioria dos casos são animais de descarte, apresentando 5 anos ou mais e os machos por serem abatidos com menor idade, se concentram na faixa de 2 a 3 anos como sugerem SOUTELLO et al. (2003).

TABELA 4 - Frequência de detecção de DNA de *Brucella* spp em função da idade, Goiânia-GO, 2011

PCR	Negativo	%	Positivo	%	p
Idade					
Até 3 anos	16	69,6	10	58,8	
Acima de 4 anos	7	30,4	7	41,2	0,521
Total	23	100,0	17	100,0	

p= significância estatística

Teste Exato de Fisher

5.4 Método FTA[®] Elute

A reação em cadeia pela polimerase em Tempo Real vem sendo utilizada na detecção de vários agentes patogênicos presentes nos diversos materiais clínicos de origem animal.

Esta técnica vem sendo indicada para detecção de agentes fastidiosos, permitindo o diagnóstico em amostras deterioradas ou até mesmo contaminadas e, principalmente, no monitoramento de excreção de agentes infecciosos (PACHECO, 2007).

Dentro deste contexto, a detecção molecular do gênero *Brucella* apresenta-se como mais vantajosa em relação às técnicas convencionais, visto a rapidez na execução, além da sensibilidade, especificidade e ainda por gerar resultados promissores.

O método FTA[®] Elute surge como uma alternativa interessante no diagnóstico de DNA de *Brucella* spp, uma vez que auxilia nos processos de colheita, armazenamento, transporte e conservação das amostras, além de facilitar a detecção do agente, dispensando técnicas convencionais de isolamento do microrganismo, diminuindo assim os riscos de contaminação dos laboratoristas pela manipulação do agente, devido à formação de aerossóis e a possibilidade de penetração em pele lesionada e até mesmo íntegra.

Com vistas à execução da metodologia empregada neste estudo, constatou-se que o emprego dos cartões de celulose – cartões FTA[®] Elute atendeu às expectativas quanto à sua utilização, pois permitiu a detecção do DNA do gênero *Brucella* em amostras provenientes de matadouros-frigoríficos, conferindo praticidade no processo de colheita de amostras, visto a pequena quantidade de material a ser fixado no cartão, além da rapidez e segurança no envio das amostras ao laboratório, devido à inativação dos patógenos que por ventura pudessem estar fixados na matriz fibrosa do cartão.

Além disso, a utilização do método FTA[®] proporcionou a redução do custo e tempo necessários para o processamento de amostras e obtenção do DNA, pois o cartão, ao possuir agentes quelantes e desnaturantes adsorvidos capazes de eliminar o poder infectocontagioso dos patógenos, permitiu a liberação do DNA e o manteve imobilizado nas fibras da matriz do cartão, eliminando o processo convencional de extração de DNA.

Deste modo, tornou-se possível obter um diagnóstico rápido e seguro pela associação do método FTA[®] Elute e a PCR em Tempo Real em ambiente de abate, atuando como uma excelente ferramenta auxiliar no julgamento de carcaças e vísceras dos animais suspeitos de brucelose, podendo ser aplicada

para a obtenção de diagnóstico diferencial, como suporte nos critérios adotados pela inspeção sanitária de rotina nos estabelecimentos de abate.

6 CONCLUSÕES

- A técnica de PCR em Tempo real permitiu detectar o DNA de *Brucella* spp de forma segura, rápida e precisa em 42,5% dos bovinos que apresentaram lesões sugestivas e em 38,3% das amostras totais, podendo ser empregada como método auxiliar de diagnóstico no processo de julgamento e destino de carcaças e vísceras dos animais de abate pelo Serviço de Inspeção Federal;
- As lesões consideradas características da enfermidade como bursite cervical, alterações no aparelho reprodutor, bem como não características como lesões macroscópicas de vísceras e linfonodos, apresentaram resultados positivos para *Brucella* spp.
- As lesões de bursite cervical apresentaram maior frequência de detecção do DNA de *Brucella* spp revelando assim a importância dessa lesão como sugestiva da presença do patógeno e conseqüentemente para o critério de julgamento de carcaças e vísceras a ser adotado pelo médico veterinário inspetor.
- O emprego da técnica de PCR em Tempo Real associada à utilização dos cartões de celulose FTA[®] Elute constitui uma ferramenta importante para os médicos veterinários inspetores, pois permite a colheita de amostras e remessa de material ao laboratório de forma rápida e segura, além do sequestro de carcaças e, principalmente, a adoção de um critério de julgamento preciso por obter em tempo hábil de 24-48 horas o diagnóstico das lesões sugestivas detectadas durante a inspeção sanitária de abate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Volumem I: bacteriosis y micosis. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001, p. 28-56 (Publicación Científica, 580).
2. AL DAHOUK, S.; LE FLECHE, P.; NOCKLER, K.; JACQUES, I.; M. GRAYON, M.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis, **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v. 69, p.137–145, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261338>. Acesso em: 13 jan. 2011.
3. ALMEIDA, L. P.; REIS, D. O.; GERMANO, P. M. L. Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob inspeção federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, [online] v. 30, n. 2, abr.2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782000000200015&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 12 mai. 2009.
4. ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. Paris, France, 190 p.
5. ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a multiples PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v.42, n.4, p.1734–1738, abr. 2004. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/vol42/issue4/index.dtl>. Acesso em: 10 dez. 2010.
6. AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S., FERREIRA, F. Modelagem matemática do controle de brucelose bovina por vacinação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, [online], v. 61, supl. 1, p.135-141, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61s1/a17v61s1.pdf>. Acesso em: 15 set. 2010.
7. AMIN, A. S.; HAMDY, M. E.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 83, n. 1, p. 37-44, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524164>. Acesso em: 22 out. 2010.
8. ANGREVES, G. M. **Avaliação etiológica de bursite cervical e correlação com a brucelose em bovinos abatidos no estado de Mato Grosso**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
9. APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan® food pathogen detection kits** PROTOCOLO: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella entérica*. manual técnico [on line], versão 1, USA, Jan, 2008. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/sxve0o1r.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2010.

10. APPLIED BIOSYSTEMS. **StepOnePlus™ Real-Time PCR System**. Disponível em: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=604109>. Acessado em: 26 de out. 2010.

11. ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI, S. C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, O. G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinaria México**, Mexico, [online], v. 32, n. 2, p. 131-139, abr-jun. 2001. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2001/vm012f.pdf>. Acesso em 13 jan. 2011.

12. AZEVEDO, S. S.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V. C.F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SOUZA, A. C.; VASCONCELLOS, S. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, [online], v. 61, supl. 1, p.19-26, 2009. Disponível em: <http://200.144.190.38:8180/xmlui/handle/1/210c>. Acesso em: 16 jul. 2010.

13. BAILY, G.G., KRAHN, J.B., DRASAR, B.S., STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, Oxford, [online], v. 95, n. 4, p. 271–275, ago. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1495123>. Acesso em: 16 jun. 2009.

14. BALDWIN CL, PARENT M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 367-382, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414157>. Acesso em: 14 jan. 2011.

15. BECKETT, S. M.; LAUGHTON, S. J.; POZZA, L. D.; MCCOWAGE, G. B.; MARSHALL, G.; COHN, R. J.; MILNES, E.; ASHTON, L. J. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiological studies examining pediatric populations. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, [online], v. 167, n. 10, p. 1260-1267. 2008. Disponível em: <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/reprint/167/10/1260>. Acesso em: 11 mai. 2009.

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

17. BOGDANOVICH, T.; SKURNIK, M.; LÜBECK, P. S.; AHRENS, P.; HOORFAR, J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. **J. Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 42,

n. 5, p. 2261–2263, mai. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131207>. Acesso em: 26 ago. 2010.

18. BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; HÉNAULT, S.; ZYGMUNT, M. S.; POLIAK, S.; GARIN-BASTUJI, B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 137, n. 1, p. 156-164, mai. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200666>. Acesso em: 14 set. 2009.

19. BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União, Brasília, seção I, p. 10785, 07 jul. 1952. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 15 mai. 2009.

20. BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diagnóstico de saúde animal**, Brasília, 1977. 735p.

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

22. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD67FE040A8C07502246C>. Acesso em: 3 abr. 2009.

23. BRICKER, B. J., HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, nov., 1994.

24. BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 435-446, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414163>. Acesso em: 24 set. 2009.

25. BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 351-364, set. 1956. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2217862/>. Acesso em: 16 dez. 2010.

26. CAMPANÃ, R. N.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUCA, M. M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 2003. 20p.

27. CAMPOS, D. I.; COELHO, H. E.; KAMIMURA, R.; ARANTES, V. M. A. Alterações microscópicas em linfonodos de bovinos sorologicamente positivos

para brucelose. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, [online], v.12, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2009. Disponível em: <http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/view/2965/2166>. Acesso em: 29 nov. 2010.

28. CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, London, [online], v. 5, n. 13, mar. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435926/>. Acesso em: 19 dez. 2010.

29. CARDUCCI, C.; ELLUL, E.; ANTONOZZI, I.; PONTECORVI, A. DNA elution and amplification by polymerase chain reaction from dried blood spots. **Biotechniques**. London, v. 13, n. 5, p. 735-737, nov. 1992.

30. CARMICHAEL, L. E; BRUNER, D. W. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **The Cornell veterinarian**, Ithaca, v. 48, n. 4, p. 579-592, out. 1968.

31. CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991. p. 196-201.

32. CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. Brucelose: Alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, Lisboa, [online], v. 2, n. 4, p. 259-261. 1995. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>. Acesso em: 18 abril. 2009.

33. ÇETINKAYA, B.; ÖNGÖR, H.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; KALENDER, H.; ERGOGAN, H. M. Detecton of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. **Veterinary Record**, London, [online], v. 144, n. 9, p. 239-240, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10189677>. Acesso em: 12 set. 2010.

34. CLOECKAERT, A., VERGER, J. M., GRAYON, M., GREPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 2111-2121, 1995.

35. CLOECKAERT, A.; VERGER, J.; GRAYON, M.; PAQUET, J.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes and Infection**, Paris, [online], v. 3, p. 729-738, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489421>. Acesso em 18 jan. 2011.

36. CORBEL, M. J. Brucellosis: an Overview. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, p. 213-221, 1997.

37. CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Madsj, 1992. p. 213-215.

38. CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; GENOVEZ, M.E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetus by polymerase chain reaction. **Australian veterinary journal**, Sydney, [online], v.79, n. 7, p. 500-501, jul. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549051>. Acesso em: 20 fev. 2010.

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

40. COSTA, I. C.; MESQUITA, A. J.; LINHARES, G. F. C.; FREITAS, M. R. Emprego da reação em cadeia da polimerase, ELISA, soroaglutinação rápida e cultivo microbiológico na elucidação da etiologia da bursite cervical. **Revista brasileira de ciência veterinária**, Niterói, v. 8, n. 3, p. 155-159, set./dez. 2001.

41. DA COSTA, M.; GUILLOU, J. P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIE´BAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **The Journal of applied bacteriology**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 267–275, set. 1996.

42. DEBEAUMONT, C.; FALCONNET, P.A.; MAURIN, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, Berlin, [online], v. 24, n. 12, p. 842-845, dez. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341519>. Acesso em: 22 out. 2010.

43. DOBBS, L. J.; MADIGAN, M. N.; CARTER, A. B.; EARLS, L. Use of FTA Gene Guard Filter Paper for the Storage and Transportation of Tumor Cells for Molecular Testing. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Chicago, [online], v. 126, n. 1, p. 56-63, jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800648>. Acesso em: 13 dez. 2010.

44. DORAK, M. T. Real-time PCR. **Advanced Method Series**, London, [online], p. 1-11, 2006. Disponível em: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>. Acesso em: 05 abr. 2008.

45. DUARTE, C. A. B. **Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo real** [online]. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/6246/1/56418|CESAR%20AUGUSTO%20BARROS%20DUARTE%20TESE%20MESTRADO%20BIOLOGIA%20CELULAR.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2009.

46. FEKETE, A.; BANTLE, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, Columbia, [online], v. 4, n. 1, p. 79-83, jan. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1554774>. Acesso em: 13 jan.

2010.

47.FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 57, p. 2688–2693, 2007. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/57/11/2688>. Acesso em 22 jan. 2011.

48.FOSTER, J. T.; OKINAKA, R. T.; SVENSSON, R.; SHAW, K.; DE, B. K.; ROBISON, R. A.; PROBERT, W. S.; KENEFIC, L. J.; BROWN, W. D.; KEIM, P. Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. **Journal of clinical microbiology**, Washington, [online], v. 46, n. 1, p. 296–301, jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032628>. Acesso em: 25 out. 2010.

49.FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. Pesquisa de infecção brucélica em bovídeos abatidos portadores de bursite. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v. 72, n. 4, p.427-433, out./dez., 2005. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72_4/freitas.PDF. Acesso em: 15 abr. 2009.

50.FIGUEIRÓ, A. A. **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa e quantitativa** [online]. 2008. 83 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/25979>. Acesso em 18 dez. 2010.

51.GÁNDARA, B.; MERINO, A. L.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. **Journal of clinical microbiology**, Washington, [online], v. 39, n. 1, p. 235–240, jan. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136777>. Acesso em: 23 ago. 2010.

52.GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; VIZMANOS, J. L.; LÓPEZ-GOÑI, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis*. **Clinical chemistry**, Washington, [online], v. 52, n. 4, p. 779–781, abr. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595839>. Acesso em: 12 nov. 2009.

53.GENBANK. **Plataforma BLAST**. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/10312105?> Acesso em: 15 set.. 2009.

54.GLASS, F.; COSTA, E. A.; PINHEIRO, S. R.; ROXO, E. Cartão de FTA para extração de DNA: viabilidade de utilização em micobactérias. In: Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais [online], 2009, São Paulo. **Resumos...** O Biológico: São Paulo: Instituto Biológico, 2009. v. 71. p. 19. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v71_2/p19.pdf. Acesso em 12 dez. 2010.

55. GLYNN, B.; LAHIFF, S.; WERNECKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T. J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, [online], v. 59, n. 2, p. 126- 139, 2006. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118633814/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>. Acesso em: 18 abr. 2009.
56. GUTIÉRREZ-CORCHERO F., ARRUGA M. V., SANZ L., GARCÍA C., HERNÁNDEZ M. A., CAMPOS F. Using FTA[®] cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 75–77, mar. 2002.
57. GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J. J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, Les Ulis, [online], v. 36, n. 3, p. 313-326, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845228>. Acesso em: 17 out. 2010.
58. GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 281-297, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414149>. Acesso em: 12 jul. 2010.
59. GUARINO, A.; SERPE, L.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **The Veterinary Record**, London, v. 147, n. 22, p. 634-636, nov. 2000.
60. HALLING, S M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of bacteriology**, Baltimore, [online], v. 187, n. 8, p. 2715-2726, abr. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805518>. Acesso em: 18 nov. 2010.
61. HAMDY, M. E.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **Veterinary Journal**, London, [online], v. 163, n. 3, p. 299- 305, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090772>. Acesso em: 14 ago. 2010.
62. HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **American journal of veterinary research**, Chicago , [online], v. 49, n. 7, p.1092– 1097, jul.1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138931>. Acesso em: 07 ago. 2010.
63. HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIC, Z.; MAKAYA, P. V.; FREY, J.; ABRIL, C. 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**, Amsterdam, [online], v. 75, p. 375-378, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675856>. Acesso em: 18 out. 2010.

64. HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; HOLUB, M.; MISEREZ, R.; ABRIL, C. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, London, [online], v. 5, n. 22, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/5/22>. Acesso em: 23 ago. 2010.

65. HUDDLESON, I. F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. **American Journal of Public Health**, Boston, [online], v. 100, n. 5, p. 491-498, 1931. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1556486/>. Acesso em: 14 jan. 2011.

66. IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária - Outubro de 2010. 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201002_publica_completa.pdf. Acesso em: 10 dez. 2010.

67. IMPLN, 2010. **NanoVolume Analysis Perfected .The Implen NanoPhotometer™**. Disponível em: <http://www.alphatech.ie/pdfs/NanoPhotometer.pdf>. Acesso em: 23 set. 2010.

68. JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4. ed. v. 1. Academic Press: San Diego, 1993. p.183-439.

69. KEID, L. B.; MORAES, Z. M.; MELVILLE, P. A.; VASCONCELLOS, S. A. Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em canis do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 42, 2002.

70. LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, [online], v. 32, p. 202-212, 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20vr2%20pag202-212.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2009.

71. LANGENEGGER, J.; SECCHIN, H.; BAPTISTA, A. M. Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio De Janeiro, v.10, p.45-49, 1975.

72. LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I. O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of clinical microbiology**, Washington [online], v. 33, n. 12, p. 3087-3090, dez. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228649/pdf/333087.pdf>. Acesso em: 24 out. 2010.

73. LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I. O.; GARCIA-CANTU, J.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 75, p. 91-97, jul. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865155>. Acesso em: 12 set. 2009.

74. LEYLA, G.; KADRI, G.; UMRAN, O. K. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 93, n. 1, p. 53-61, mai. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591206>. Acesso em: 5 out. 2010.

75. LIRA, N. S. C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepucial e conjuntival simultaneamente** [online], 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co obra=113320. Acesso em: 11 ago. 2010.

76. MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infectious**, Oxford, [online], v.10, n.3, p.190-212, mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>. Acesso em: 28 nov. 2010.

77. MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J. M.; MARIN, C. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 92, n. 1-2, p. 65-72, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488071>. Acesso em: 14 nov. 2010.

78. MAS, S.; CRESCENTI, A.; GASSÓ, P.; VIDAL-TABOADA, J. M.; LAFUENTE, A. DNA cards: determinants of DNA yield and quality in collecting genetic samples for pharmacogenetic studies. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Copenhagen, [online], v. 101, n. 2, p. 132-137, aug. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651316>. Acesso em: 14 nov. 2010.

79. MATRONE, M.; KEID, L. B.; ROCHA, V. C. M.; VEJARANO, M. P.; IKUTA, C. Y.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, [online], v. 40, p. 480-489, 2009. Disponível em: http://200.144.190.38:8180/xmlui/bitstream/handle/1/341/FMVZ_VPS_ART_FERREIRA_Evaluation%20of%20DNA_2009.pdf?sequence=1. Acesso em: 29 out. 2010.

80. MENSE, M.G.; BORSCHEL, R.H.; WILHELMSSEN, C.L; PITT, M.L; HOOVER,

D.L. Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, [online], v. 65, n. 5, 2004. Disponível em: http://www.avma.org/avmacollections/zu/ajvr_65_5_644.pdf. Acesso em 03 dez. 2010.

81. MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia PCR** [online]. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-15062007-114720/pt-br.php>. Acesso em: 18 out. 2010.

82. MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. 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**, São Paulo, [online], v. 38, p. 17-22, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v38n1/arg05.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2010.

83. MINHARRO, S. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil** [online]. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/LGPD-7SUNFX>. Acesso em: 25 jan. 2010.

84. MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 209–227, dez. 2002. Disponível em; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414145>. Acesso em: 23 out. 2010.

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

86. MUTHUKRISHNAN, M.; SINGANALLUR, N. B.; RALLA, K.; VILLUPPANOOR, S. A. Evaluation of FTA[®] cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, [online], v. 151, n. 2, p. 311-316, ago. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584888>. Acesso em: 12 dez. 2010.

87. NASSAR, A. M. **Acordos bilaterais batem à nossa porta**. BeefPoint – Rede AgriPoint Consultoria Ltda. 2010. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/acordos-bilaterais-batem-a-nossa-porta-noticia6829415117.aspx>. Acesso em: 12 jan. 2011.

88. NAVARRO, E., CASAO, M.A., SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, London, [online], v. 4, n. 1, p. 115-123, jan. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711354>. Acesso em: 11 jul. 2010.
89. NDUNGURU, J.; TAYLOR, N.J.; YADAV, J.; ALY, H.; LEGG, J.P.; AVELING, T.; THOMPSON, G. e FAUQUET, C.M. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. **Virology Journal**, London, [online], v. 2, n. 45, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904535>. Acesso em: 12 dez. 2010.
90. NETA, A. V. C.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXAO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, London, [online], v. 184, n. 2; p. 146-155, sep. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733101>. Acesso em: 19 set. 2010.
91. NEWBY, D. T.; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, [online], v. 69, n. 8, p. 4753–4759, ago. 2003. Disponível em; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902268>. Acesso em: 11 jul. 2009.
92. NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in veterinary science comparative medicine**, New York , v. 24, p.69-98, 1980.
93. NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v.90, n.1-4, p.5-9, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414128>. Acesso em: 18 mai. 2009.
94. NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 100, n. 1-2, p. 25-30, mai. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135510>. Acesso em: 16 dez. 2010.
95. NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em 15 jan. 2010.
96. NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de métodos diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*** [online]. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu. Disponível em: http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064022P3/2008/nozaki_cn_dr_botfmvz.pdf. Acesso em: 27 dez.. 2010.

97. OCAMPO-SOSA, A. A.; GARCÍA-LOBO, J. M. Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. **BioMed Central Microbiology**, London, [online], v. 8, n. 17, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266754/>. Acesso em: 12 fev. 2010.
98. OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code**. 2009. Chapter 11.3. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_11.3.htm. Acesso em: 12 dez. 2010.
99. O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk, lymph tissue of serologically positive cows. **Research in veterinary science**, London, [online], v. 81, n. 2, p. 170-176, out. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545848>. Acesso em: 12 mai. 2009.
100. OLIVEIRA, J. P. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em bovinos e bubalinos abatidos para consumo**. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará.
101. ORLANDI, P. A.; LAMPEL, K. A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 38, n. 6, p. 2271-2277, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834988>. Acesso em: 10 dez. 2010.
102. OUAHRANI, S., MICHAUX, S., WIDADA, J.S., BOURG, G., TOURNEBIZE, R., RAMUZ, M., LIAUTARD, J.P. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **Journal of general microbiology**, London, [online], v. 139, n. 12, p. 3265-3273, dez. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126444>. Acesso em: 13 jul. 2010.
103. OWOR, B. E.; SHEPHERD, D. N.; TAYLOR, N. J.; EDEMA, R.; MONJANE, A. L.; THOMSON, J. A.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A. Successful application of FTA[®] Classic Card technology and use of bacteriophage phi29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.140, p.100–105, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174409>. Acesso em: 12 dez. 2010.
104. PACHECO, W. A. **Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo** [online]. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14092007-144915/pt-br.php>. Acesso em: 28 dez. 2010.
105. PAJUABA, A. C. A. M. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de**

anticorpos pro- duzidos por bovinos vacinados e não-vacinados [online]. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. Disponível em: http://www.btdt.ufu.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=502. Acesso em: 14 jun. 2010.

106. PARDI, M.C.; ROCHA, U.F.; SALIBRA, A. *Brucella abortus* (Bang) como causa de bursite cervical em bovinos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio De Janeiro, v. 24, p. 25- 34,1956.

107. PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Aspectos higiênico-sanitários da carne. Zoonoses mais comuns adquiridas profissionalmente por manipuladores de carne. In: **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, 2 ed.,Goiânia: CEGRAF-UFG/ Niterói: EDUFF, 2006. p. 358-359.

108. PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v. 69, n. 2, p. 105-112, 2002. Disponível em: http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/98/DEFESA/BRUCELOSE_EXP%20BRASILEIRA%20COMBATE.pdf. Acesso em: 12 jul. 2010.

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

110. PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v. 75, n. 3, p. 389-401, jul./set., 2008. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v75_3/paulin.pdf. Acesso em: 20 out. 2009.

111. PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN S.; DOMÍNGUEZ, W.; APPLGATE B. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of applied Methods & Automation in Microbiology**, Washington, [on line], v. 15, n. 2, p. 176-198, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4581.2007.00083.x/pdf>. Acesso em: 05 jan. 2011.

112. PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. **Medicina Interna**, Lisboa, [online], v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2009.

113. PICARD-MEYER, E.; BARRAT, J.; CLIQUET, F. Use of filter paper (FTA[®]) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. **Journal of virological methods**, Amsterdam, [online], v. 140, n. 1-2, p. 174–182, mar. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157394>. Acesso em: 11 dez. 2010.

114. POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, p.55-62, 2002. Disponível

em:<http://cni.inta.gov.ar/zoonosis/pdf%20Publ.y%20otr/Brucellosis%20in%20Brazil.pdf>. Acesso em 21 nov. 2009.

115. POESTER, F. P., SAMARTINO, L. E. LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n. 47, p.13-29, 2005.

116. POESTER, F. P. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas** [online]. 2006. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em:http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/ModuloIII/EFICA_CIA%20DA%20VACINA%20RB51%20EM%20NOVILHAS.pdf. Acesso em: 13 dez. 2010.

117. POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61s1/a01v61s1.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2010.

118. PROBERT, W.S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, [online], v. 42, n. 3, p. 1290-1293, mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004098>. Acesso em: 13 ago. 2010.

119. PURVIS, L. B.; VILLEGAS, P.; PEROZO, F. Evaluation of FTA[®] paper and phenol for storage, extraction and molecular characterization of infectious bursal disease virus. **Journal of virological methods**, Amsterdam, [online], v. 138, n.1-2, p. 66–69, dez. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978712>. Acesso em: 12 dez. 2010.

120. QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; MORATA, P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; COLMENERO, J. D. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, Washington, [online], v. 35, n. 11, p. 2927-2930, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC230089/pdf/352927.pdf>. Acesso em: 14 set. 2010.

121. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.963-994.

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

2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2005.00570.x/abstract>. Acesso em: 08 jan. 2010.

123. RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F. M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H. N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA[®] matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v. 67, n. 3 p. 582–592, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859786>. Acesso em: 14 nov. 2010.

124. REDKAR, R., ROSE, S., BRICKER, B., DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, London, [online], v. 15, n. 1, p. 43-52, fev. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162079>. Acesso em: 27 jul. 2010.

125. RIBEIRO, M.G.; NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P. Aglutininas anti-*Brucella abortus* no soro e em secreção de bursite cervical em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, fev. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352003000100015&script=sci_arttext. Acesso em: 7 jan. 2011.

126. RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, [online], v.32, n. 2, p.83-92, abr./jun. 2008. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em: 15 dez. 2010.

127. RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. And *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v.87, n. 2, p.139 - 147, mai. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034542>. Acesso em: 15 jan. 2011.

128. ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L.; BRITO, W. M. E. D.; DIAS, R. A.; DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, [online], v. 61, supl. 1, p. 27-34, 2009. Disponível em: <http://b/www.scielo.br/pdf/abmvz/v61s1/a05v61s1.pdf>. Acesso em: 22 set. 2010.

129. RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZUTKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, [online], v. 18, p. 306-319, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleURL&udi=B6VHY4N1466T2&user=10&rdoc=1&fmt=&orig=search&sort=d&view=c&acct=C000050221>

[& version=1& urlVersion=0& userid=10&md5=5ba1113d42971418aa24a3c2132af46a](#) . Acesso em: 15 abr. 2009.

130. ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GONI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 33, n. 3, p. 615-617, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227999/pdf/330615.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2009.

131. ROSSETTI, O. L.; ARESE, A. I., BOSCHIROLI, M. L.; CRAVERO, S. L. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-Kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 34, n. 1, oct. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8748294>. Acesso em: 15 out. 2010.

132. SANTANA, D. C.; VEIGA, L. S. Brucelose bovina em Goiás. In: ENCONTRO DE PESQUISA, 1., 1982, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EV-UFG, p.6-8, 1982.

133. SANTOS, C. R.; ANGELI, S.; MICHELON, C.; SCHMID, K.; SILVA, M. S. N.; ROSSETTI, M. L. R. Detecção de DNA de Mycobacterium tuberculosis em amostras de sangue total utilizando o sistema FTA[®] card. **Revista de iniciação científica da ULBRA 2009/2010**, Canoas, [online], v. 1, n. 1, p. 85 a 91. 2009/2010. Disponível em: <http://www.ulbra.br/pesquisa/files/revista-de-iniciacao-cientifica-da-ulbra-2009.pdf>. Acesso em 15 dez. 2010.

134. SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 58, p. 375–382, 2008. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/58/2/375>. Acesso em: 22 jan. 2011.

135. SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 60, n. 4, p. 801-808, abri. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661515>. Acesso em 17 jan. 2011.

136. SCOTT, J. C.; KOYLASS, M. S.; STUBBERFIELD, M. R.; WHATMORE, A. M.; Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, [online], v. 73, n. 22, p. 7331-7337, nov. 2007. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/content/short/73/22/7331>. Acesso em: 12 dez. 2010.

137. SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, London, v. 66, n. 2, p. 313-317, mai. 1999.
138. SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n.47, p.1-12, 2005
139. SILVA JUNIOR, F. F. **Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigoríficos pela sorologia, bacteriologia e PCR**. 2008. 64f. Tese. (Doutorado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
140. SILVA, A. V.; OLIVEIRA, D. E. C.; LIMA, D. A. L. L. Segurança Alimentar: Estudo sobre a Produção de Alimentos em Goiás, 1990-2009. In: V ENCONTRO NACIONAL DA ANPPAS, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis- ANPPAS , 2010. Disponível em: <http://www.anppas.org.br/encontro5/cd/artigos/GT4-202-123-20100903075610.pdf>. Acesso em 10 jan. 2011.
141. SILVA, D. L. **Arquivos do Serviço de Inspeção Federal – SIF 1750**.
142. SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA[®] databasing paper. **BioMed Central Ecology**, Londres, [online], v. 4, n. 4, p. 1472-6785, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC406513/>. Acesso em: 12 mai. 2009.
143. SOUTELLO, R. V. G.; FERNANDES, J. O. M.; BRAZ, M. A.; MANGOLD, M. A.; PEREIRA, R. C. Idade ao abate de bovinos em frigoríficos no município de Andradina-SP. **Revista Ciências Agrárias e da Saúde FEA**, Andradina, v. 3, n.1, p. 11 – 18, jan-jun, 2003. Disponível em: <http://www.fea.br:82/joomla/Arquivos/Revista%20Cientifica/Volume%2003%20N%C2%BA%2001%202003/Idade%20ao%20abate%20de%20bovinos.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2010.
144. STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat *Neotoma lepida* Thomas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, out. 1957.
145. VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZALEZ, D.; ZÄHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative *Ochrobactrum* spp, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Washington, [online], v. 68, n. 6, p. 3210–3218, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816465>. Acesso em: 13 dez. 2010.
146. VEJARANO RUIBAL, M. D. P. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308** [online].

2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13072009-111831/pt-br.php>. Acesso em: 22 abr. 2010.

147. VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082 p.

148. VIANA, L.; BAPTISTA, F.; TELES, J. RIBEIRO, A. P. C.; PIGATTO, C. P. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v.77, n.3, p.517-520, jul./set., 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v77_3/viana.pdf. Acesso em 12 jan. 2011.

149. VIDAL-TABOADA, J. M.; CUCALA, M.; HERRERO, S. M.; LAFUENTE, A.; COBOS, A. Satisfaction survey with DNA cards method to collect genetic samples for pharmacogenetics studies. **BMC Medical Genetics**, London, [online], v. 7, n. 45, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479321/>. Acesso em: 14 ago. 2010.

150. VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados** [online]. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-16062005-103008/pt-br.php>. Acesso em: 12 dez. 2010.

151. XAVIER, M. N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos** [online]. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta_o_mnx_final.pdf. Acesso em: 9 mai. 2010.

152. XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of comparative pathology**, London, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111839>. Acesso em: 22 jun. 2010.

153. WHATMAN. **FTA® nucleic acid collection, storage and purification**, USA, 2007. Disponível em: <http://www.whatman.com/FTANucleicAcidollectionStorageandPurification.aspx>. Acesso em: 15 mai. 2010.

154. WHATMAN. **FTA® Elute Technology**, USA, 2009. Disponível em: <http://www.whatman.com/FTAElute.aspx>. Acesso em: 12 jan. 2010.

155. WOLFGRAMM, E. V.; CARVALHO, F. M.; AGUIAR, V. R.; SARTORI, M. P.; HIRSCHFELD-CAMPOLONGO, G. C.; TSUSUMIDA, W. M.; LOURO, I. D. Simplified Buccal DNA Extraction with FTA[®] Elute Cards. **Forensic science international: Genetics**, Amsterdam, [online], v. 3, n. 2, p. 125–127, mar. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215882>. Acesso em: 13 dez. 2010.

156. ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 39, n. 4, p. 1661-1664, abr. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283112>. Acesso em 22 nov. 2010

ANEXOS

		SOLICITAÇÃO DE ANÁLISES AGENTES ALVOS - PROJETO CDA - MAPA - DICAUS		INSTITUIÇÃO Nome: _____ End.: _____ CEP: _____		REQUISITANTE Nome: _____ End.: _____ CEP: _____	
Data de envio da solicitação: _____ / ____ / ____ Informações de Entrega: _____				Número da solicitação: _____ CMPU			
Endereço UF: _____ CEP: _____		UF: _____ CEP: _____		Caráter Pedido: _____			
Telefone 1: _____ Telefone 2: _____ Telefone 3: _____				Forma de Pagamento: _____ Valor: R\$ _____			
Nome: _____ Foto (colado): _____		CPF: _____ RG: _____		Assinatura (colada): _____ Data: _____			
Endereço de Entrega: _____ UF: _____ CEP: _____		UF: _____ CEP: _____		Observações: _____			
Nome: _____ Foto (colado): _____		CPF: _____ RG: _____		Assinatura (colada): _____ Data: _____			
Endereço de Entrega: _____ UF: _____ CEP: _____		UF: _____ CEP: _____		Observações: _____			
Nome: _____ Foto (colado): _____		CPF: _____ RG: _____		Assinatura (colada): _____ Data: _____			
Endereço de Entrega: _____ UF: _____ CEP: _____		UF: _____ CEP: _____		Observações: _____			

FIGURA 10- Modelo de solicitação para encaminhamento de amostras
 Fonte: Centro de Pesquisa em Alimentos (2010)

TABELA 5 - Determinação das variáveis analisadas quanto à detecção do DNA de *Brucella* spp em bovinos abatidos suspeitos de brucelose, Goiânia, 2011

Fator	Animais	%
Sexo		
Macho	36	90,0
Fêmea	4	10,0
Total	40	100,0
Idade		
Até 3 anos	26	65,0
Acima de 4 anos	14	35,0
Total	40	100,0
Procedência		
Norte	2	5,0
Noroeste	7	17,5
Leste	5	12,5
Centro	12	30,0
Sul	14	35,0
Total	40	100,0
Lesão Abate		
Não	22	55,0
Sim	18	45,0
Total	40	100,0

TABELA 6 - Distribuição de frequência dos animais avaliados e de positivos quanto à detecção do DNA de *Brucella* spp, segundo os municípios de origem, Goiânia, 2011

Municípios	Número de animais	Resultados positivos
Acreúna-GO	2	-
Amaralina-GO	1	1
Amorinópolis-GO	2	1
Anápolis-GO	1	-
Campo Limpo-GO	1	-
Cezarina-GO	1	-
Cristalina-GO	1	1
Faina-GO	1	-
Goianira-GO	1	-
Goiás Velho-GO	1	-
Iaciara-GO	1	1
Ipameri-GO	1	1
Itaguaru-GO	2	1
Jataí-GO	3	1
Jussara-GO	2	-
Mara Rosa-GO	1	1
Montes Claros de Goiás	1	-
Morrinhos	1	1
Nazário	1	-
Nova Veneza-GO	1	1
Novo Mundo-GO	1	1
Padre Bernardo-GO	1	1
Panamá-GO	1	1
Pires do Rio-GO	2	1
Posse-GO	1	1
Sanclerlândia-GO	2	-
Santa Cruz de Goiás	2	-
Silvânia-GO	1	-
Taquaral de Goiás	1	1
Terezópolis-GO	1	-
Vila Boa-Go	1	1
Total	40	17