SIMONE MIYASHIRO

**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)**

São Paulo

2004

SIMONE MIYASHIRO

**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)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Margareth Élide Genovez

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1376
FMVZ

Miyashiro, Simone

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) / Simone Miyashiro. – São Paulo : S. Miyashiro, 2004.

75 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Margareth Élide Genovez.

1. Reação em cadeia por polimerase. 2. Laticínios. 3. Brucelose animal.
4. Bovinos. 5. Vacina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Presença de DNA de *Brucella abortus* em leite e subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação de cepas de origem vacinal e de campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)", protocolo nº319/2003, sem utilização de animais, somente amostras de produtos lácteos, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Margareth Élide Genovez (Inst.Biológico/SP), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Presence of *Brucella abortus* DNA in clandestine milk and dairy products: differentiation of vaccine and field samples by the polymerase chain reaction (PCR)" protocol number 319/2003, utilizing just dairy products, under the responsibility of Prof^a Dr^a Margareth Élide Genovez (Inst.Biológico/SP), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun").

São Paulo, 12 de junho de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: MIYASHIRO, Simone

Título: 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)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais

Que me guiaram no caminho do estudo, da pesquisa e da vida. Sempre com cuidado, amor e sabedoria.

À minha querida Ba Luzia

Guerreira, com profundas marcas causadas pela dureza da vida. E, se hoje concluo este estudo, é porque tudo começou com a sua braveza, perseverança e luta por um futuro melhor para todos nós.

À minha família

Única e especial. Sempre unida nos melhores momentos das nossas vidas, e nas horas mais difíceis. Obrigada pelo apoio e pelas boas horas de descontração.

Ao Adriano

Que tem me acompanhado sempre de pertinho, com atenção, compreensão, carinho e amor. Presença fundamental na minha vida, que me trouxe muita paz e felicidade.

Obrigada a todos vocês, pelo companheirismo, incentivo e pela torcida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

à minha super orientadora, Margareth Élide Genovez, pela grande competência, ensinamentos constantes e amizade;

às minhas orientadoras extra-oficiais, Eliana Scarcelli e Rosa Maria Piatti, amigas, colaboradoras de todas as horas;

ao Dr. Airton Vialta, pelo fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho;

às meninas do IB: Antera, Fabiola, Lilia, Mariazinha, Maristela, Solange, Tati, Vã*** e Wanessa, pelas boas horas de convívio;

ao Prof. Silvio Arruda Vasconcellos, pela constante preocupação com a pós graduação e os pós-graduandos, e sua importante participação na minha formação;

à Adriana Cortez, por ter me iniciado no mundo da biologia molecular;

à Lara Borges Keid, pelo fornecimento das várias estirpes de *Brucella* spp. e altos papos;

ao Ricardo Dias, pela ajuda na confecção do mapa da dissertação e pelas boas conversas;

à Vet 62, que deixou saudades e boas recordações;

aos amigos do curso de Pós-Graduação, pelo crescimento conjunto, festinhas, churrascos, reuniões e boas risadas;

aos funcionários do VPS;

à equipe super competente da Biblioteca da FMVZ – USP;

à FAPESP pelo auxílio à pesquisa fornecido para a realização deste trabalho;

à CAPES e à Pró-Reitoria da USP, pela bolsa de estudos.

RESUMO

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). [Presence of *Brucella abortus* DNA in clandestine dairy products: differentiation between vaccinal (B19) and field strains by polymerase chain reaction (PCR)]. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A técnica de PCR, utilizando-se “primers” desenhados a partir do gene que codifica uma proteína imunogênica de 31 KDa de *Brucella abortus*, foi empregada na detecção de *Brucella* spp. em 300 amostras de produtos lácteos clandestinos apreendidas em municípios dos Estados de São Paulo (SP) e de Minas Gerais (MG). Foram analisadas 49 amostras de queijo minas frescal e 18 de queijo meia-cura provenientes de MG, e 92 amostras de queijo minas frescal, 33 amostras de queijo meia-cura e 108 amostras de leite cru provenientes de SP. O isolamento bacteriano foi tomado como referência, porém não se isolou *Brucella* spp. de nenhuma das amostras cujos cultivos mostraram-se contaminados com outros gêneros bacterianos. Pela PCR foi observado que 37 amostras de queijo foram positivas: 29/141 (20,56 %) das amostras de queijo minas frescal e 8/51 (15,68%) das amostras de queijo meia-cura. Todas as amostras positivas na PCR para *Brucella* spp. foram confirmadas como sendo da espécie *Brucella abortus* pela técnica de PCR utilizando-se “primers” espécie-específicos. Foi instituída a reação de hemi-nested PCR para a diferenciação da cepa em B19 ou campo tomando-se como base a deleção genética de 702 pb existente na cepa vacinal B19. A padronização da técnica permitiu que todas as cepas de *Brucella* spp. fossem diferenciadas, revelando que 30 (81,08%) amostras eram B19 e 7 (18,92%) eram cepas de *Brucella abortus* de campo. A concordância estimada

entre as técnicas de PCR e do cultivo microbiológico através do indicador *Kappa* foi considerada baixa ($K = 0$) devido ao não isolamento do microrganismo.

Palavras-chave: Reação em cadeia por polimerase. Laticínios. Brucelose animal. Bovinos. Vacina.

ABSTRACT

MIYASHIRO, S. **Presence of *Brucella abortus* DNA in clandestine dairy products: differentiation between vaccinal (B19) and field strains by polymerase chain reaction (PCR).** [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)]. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A PCR assay using primers designed based on the gene that encodes a 31 KDa immunogenic protein from *Brucella abortus* was used in the detection of *Brucella* spp. in 300 samples of illegal dairy products obtained in cities of the states of São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG), Brazil. A total of 49 samples of *minas frescal* cheese and 18 samples of *meia-cura* cheese from MG were analyzed, besides 92 samples of *minas frescal* cheese, 33 samples of *meia-cura* cheese and 108 samples of raw milk from SP. Although bacterial isolation was used as reference, *Brucella* spp. was not isolated from any samples in which culture was contaminated by other genera of bacteria. PCR showed that 37 samples were positive for *Brucella* spp.: 29/141 (20,56 %) of the *minas frescal* cheese samples and 8/51 (15,68%) of the *meia-cura* cheese samples. All positive samples for *Brucella* spp. were confirmed as *Brucella abortus* by PCR using species-specific primers. Hemi-nested PCR was used for the differentiation between B19 and field strains, based on the genetic deletion of 702 pb in the vaccinal strain. Standardization of the technique enabled the differentiation of all *Brucella* spp. strains, showing that 30 of them (81,08%) were B19 and 7 (18,92%) of them were *Brucella abortus* field strains. Estimated agreement between PCR and microbiological culture as determined by *Kappa*

indicator was considered to be poor ($K = 0$) due to the absence of isolation of the microorganism.

Key - words: Polymerase chain reaction. Dairy factories. Animal brucellosis. Bovine. Vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm = micrômetro

°C = graus Celsius

% = por cento

pb = pares de base

LPS = lipopolissacarídeo

et al. = e colaboradores

pH = potencial hidrogeniônico

RFC = reação de fixação do complemento

PCR = reação em cadeia pela polimerase

KDa = kilodalton

fg = fentograma

DNA = ácido desoxirribonucleico

UFC = unidade formadora de colônia

mL = mililitro

g = grama

L = litro

UI = unidade internacional

min = minuto

mM = milimolar

M = molar

TE = tampão Tris-EDTA

x g = múltiplos da gravidade terrestre (9,81 m/s²)

dNTPs = desoxirribonucleotídeos

dCTP = desoxi-citosina trifosfato

dATP = desoxi-adenosina trifosfato

dGTP = desoxi-guanosina trifosfato

dTTP = desoxi-timidina trifosfato

pmol = picomoles

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = Tris-Borato EDTA

X = vezes

TRIS = Tris (hidroximetil) amino metano

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

V = volt

cm = centímetro

nm = nanômetro

bp = base pair

PO = proporção de concordância observada

PE = proporção de concordância aleatória esperada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ETIOLOGIA	15
1.2 BRUCELOSE BOVINA	16
1.2.1 Patogenia	17
1.2.2 Vias de transmissão	18
1.2.3 Vacina B19	19
1.2.4 Sobre o eritritol	22
1.2.5 Situação leiteira no Brasil	22
1.2.6 Diagnóstico	23
1.2.6.1 Diagnóstico indireto	23
1.2.6.2 Diagnóstico direto	26
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 AMOSTRAS DE CAMPO	31
3.2 AMOSTRA DE CEPA VACINAL B19	33
3.3 AMOSTRAS DE <i>Brucella abortus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. neotomae</i> e <i>B. melitensis</i>	33
3.4 AMOSTRA DE CEPA VACINAL RB51	34
3.5 CULTIVO MICROBIOLÓGICO	34
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A PCR	35
3.6.1 Leite	35
3.6.2 Queijo minas frescal e meia cura	35
3.7 EXTRAÇÃO DE DNA	36
3.7.1 Protocolo de extração do DNA com o reagente comercial DNazol	36
3.7.2 Protocolo de extração de DNA por fervura	37
3.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	38

3.8.1 “Primers” empregados para a detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp.....	38
3.8.2 “Primers” empregados para a detecção de DNA de <i>Brucella abortus</i>	39
3.8.3 “Primers” empregados para o diferencial da origem da cepa de <i>Brucella abortus</i> em campo ou vacinal (B19).....	41
3.8.4 Comprovação da especificidade dos “primers”	44
3.8.5 Avaliação do limiar de detecção da técnica de PCR nas amostras de leite e queijo experimentalmente contaminadas com diferentes concentrações de <i>Brucella abortus</i> cepa vacinal B19 e cepa de campo.....	45
3.8.6 Análise do produto amplificado.....	45
3.9 CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE PCR E CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA <i>Brucella</i> spp.....	46
4 RESULTADOS.....	47
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto contagiosa provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella*, de evolução crônica e de caráter granulomatoso difuso, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário.

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), WHO (World Health Organization) e OIE (Office International des Épizooties), a brucelose ainda é a zoonose mais importante e difundida no mundo (POESTER, 2002).

Até o momento foram relacionadas à infecção humana as espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis*. A espécie mais patogênica e invasora é a *B. melitensis* seguida da *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*, embora a penúltima seja a mais freqüente causadora de infecção humana no mundo (ACHA; SZYFRES, 1986).

Os sinais mais evidentes da brucelose no homem são aqueles observados nos quadros de infecção generalizada aguda e ocorrem na fase de bacteremia: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios e suores noturnos profusos, que apresentam um odor característico (ACHA; SZYFRES, 1986). A temperatura pode variar de normal, pela manhã, até 40 °C à tarde. A sintomatologia da brucelose aguda consiste em astenia, fadiga, insônia, constipação, anorexia, cefaléia, artralgia e um forte impacto no sistema nervoso levando à neurastenia, depressão e impotência sexual (ACHA; SZYFRES, 1986; CARTER; CHENGAPPA, 1991). O curso da doença tende a ser crônico, as recidivas são freqüentes e variam de intensidade. A maioria dos pacientes recupera-se em um a dois anos, com ou sem tratamento. Os sintomas da forma crônica são causados pela hipersensibilidade às proteínas da bactéria (CARTER; CHENGAPPA, 1991). Nos animais compromete especialmente os

sistemas reprodutivo e ósteo-articular causando, principalmente, aborto no terço final da gestação (ACHA; SZYFRES, 1986; CARTER; CHENGAPPA, 1991; METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994).

No Brasil, a doença ocorre em todos os Estados, afetando principalmente bovinos e suínos, sendo também um dos mais sérios problemas sanitários em bubalinocultura. Também tem sido descrita em caprinos, ovinos, eqüinos e cães (GARCIA-CARRILLO, 1990).

1.1 ETIOLOGIA

A brucelose é causada pela bactéria do gênero *Brucella*, um coco bacilo curto, gram negativo, pequeno (mede de 0,5 - 0,7 x 0,6 - 1,55 μ m), pleomórfico, imóvel, não formador de cápsulas nem esporos, e que também se cora bem pelo método de Ziehl-Neelsen e Koster modificados (ALTON, 1988; CARTER; CHENGAPPA, 1991; TIMONEY et al., 1988). A capacidade de sobrevivência da brucela em condições naturais é grande se comparada a outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e em ambiente contendo matéria orgânica (OMS, 1986). No solo, com luz solar direta, o tempo de sobrevivência da bactéria é de 4 horas e 30 minutos, porém, sob sombra, este tempo aumenta para 7 meses. Nos exsudatos uterinos pode sobreviver até 200 dias ou mais e no feto abortado sobrevive até 8 meses dependendo das condições ambientais. Já no leite pasteurizado ou fervido, a *Brucella* spp. tem morte imediata, mas, se mantido a 15 °C, sobrevive até 38 dias. Sob refrigeração, no queijo camembert pode sobreviver até 32 dias e no queijo muster até 27 dias (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

As brucelas são divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas ou clássicas (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*) e as rugosas (*Brucella ovis*, *Brucella canis* e *Brucella maris*). A *B. abortus* subdivide-se em oito biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3) e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, apesar de apresentarem variantes, não se subdividem em biotipos (CORBEL, 1997; METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994; QUINN et al., 1996). As espécies de *Brucella* e seus biotipos são diferenciados de acordo com suas propriedades metabólicas, antigênicas e de cultivo, sensibilidade a fagos, patogenicidade e preferência de hospedeiro (VIZCAÍNO et al., 2000).

Cada espécie de *Brucella* pode infectar muitas espécies animais, mas mostra preferência de hospedeiro para a infecção (VIZCAÍNO et al., 2000).

No Brasil, a brucelose devido a *Brucella abortus* é a infecção brucélica mais prevalente, seguida da *B. suis* em suínos. *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isoladas no país (POESTER, 2002).

1.2 BRUCELOSE BOVINA

O principal agente para bovinos é a *B. abortus* biotipo 1, presente no mundo todo (ACHA; SZYFRES, 1986; CORBEL, 1997) e, no Brasil, até 1985, foram confirmados os biotipos 1, 2 e 3 (GARCIA-CARRILLO, 1990). Infecções nos rebanhos freqüentemente causam abortamentos e redução na produção de leite (NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Segundo Genovez et al. (1993), de 544 amostras de órgãos e anexos provenientes de 282 fetos bovinos oriundos de rebanhos na maioria leiteiros, procedentes de diversas cidades

de Estados do Brasil, verificou-se que 37,4% das causas de abortamento bovino foram de origem bacteriana, e, destes, foi isolada principalmente *Brucella abortus* em 6,2% dos fetos.

1.2.1 Patogenia

As brucelas invadem o hospedeiro pelas mucosas dos tratos digestivo, genital, nasal, conjuntiva ou então por soluções de continuidade da pele, sendo que os bovinos se infectam principalmente pelas mucosas orofaríngeas (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994). Então são levadas até os linfonodos regionais, principalmente por macrófagos, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994). Através da corrente circulatória chegam aos órgãos de predileção, ou seja, aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para o seu metabolismo, dentre os quais destaca-se o eritritol, poliálcool presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutivo masculino: testículos, epidídimo e vesícula seminal (CARTER; CHENGAPPA, 1991; OMS, 1986). A partir do quinto mês de gestação, a concentração do eritritol apresenta níveis crescentes e atinge o pico máximo com a proximidade do parto, o que estimula cada vez mais a multiplicação da bactéria (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; SAMARTINO; ENRIGHT, 1993). Na vaca, a infecção deixa de ser latente geralmente no terço final da gestação, quando o tecido cório alantoideano está bem desenvolvido e a disponibilidade de eritritol aumenta. Neste período, a multiplicação da brucela é intensa e as lesões produzidas na placenta são caracterizadas por necrose e/ou deposição de fibrina principalmente no córion. Há indícios de que a brucela libere endotoxinas após sua destruição (CARTER; CHENGAPPA, 1991) levando a processo

inflamatório dos tecidos e órgãos, causando placentite necrótica dos cotilédones, resultando no seu descolamento pela lise das suas vilosidades (METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994). Além disso, ocorre interferência na circulação fetal prejudicando a sua respiração e alimentação, podendo levá-lo à morte e, por consequência, ao abortamento. Nos casos agudos da doença, quanto maior a necrose, maior a chance de ocorrer abortamento, único sintoma aparente na maioria das infecções brucélicas (CARTER; CHENGAPPA, 1991). Em torno de duas semanas após o abortamento, como o útero não gravídico não é tão suscetível à *B. abortus*, outros órgãos em atividade são colonizados, dentre eles a glândula mamária e linfonodos supramamários, onde permanecerá pelo resto da vida da fêmea formando granulomas microscópicos no parênquima mamário e sendo excretada constante ou intermitentemente pelo leite durante as lactações (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; GARCÍA-CARRILLO, 1990; OMS, 1986).

1.2.2 Vias de transmissão

As vias de transmissão da brucelose bovina constituem-se no leite e derivados não pasteurizados, fetos abortados, carne crua, sêmen, água, forragens, pastagens, fômites e ambientes contaminados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Embora a verdadeira incidência da brucelose humana seja desconhecida, sabe-se que o consumo de alimentos contaminados e o contato ocupacional constituem as fontes mais importantes de infecção humana (CORBEL, 1997). Segundo Gallien et al. (1998) e Miller e Paige (1998), a transmissão da brucelose para o homem previamente estabelecida pelo contato com os animais domésticos parece estar sendo estendida para a transmissão através

de alimentos de origem animal, como ocorreu numa epidemia em Houston, em uma vizinhança hispânica, onde a fonte de infecção foi relacionada ao queijo de leite de cabra não pasteurizado importado do México (THOPAR; YOUNG, 1986). No México, de 1990 a 1997, a média anual da ocorrência de brucelose humana foi de 5.363 casos novos, sendo que mais de 94% das pessoas tinham se infectado devido ao consumo de alimentos contaminados, principalmente queijos e leite (PAHO/WHO, 1999). Castell et al. (1996) também relataram uma epidemia com 81 casos de brucelose humana ocorrida na Espanha, onde foi estabelecida uma forte ligação entre a doença e o consumo de queijo cottage caseiro preparado por um produtor de pequena escala de uma vila.

1.2.3 Vacina B19

No final dos anos 30, Dr. John Buck isolou um microrganismo do gênero *Brucella* a partir de uma vaca jérsei infectada, sendo que essa foi sua 19^a cepa. De alguma forma, no entanto, a cultura foi mantida em temperatura ambiente por mais de um ano e, quando foi subcultivada, Dr. Buck descobriu que o microrganismo não causava mais a doença nos bovinos, embora lhes conferisse imunidade protetora (TIZARD, 1996). Em 1941, a vacina B19 foi licenciada e tem sido largamente utilizada em bovinos desde então (PAHO/WHO, 1999).

A vacina B19, também chamada anabortina, é produzida segundo normas internacionais com amostra viva de *B. abortus* estirpe B19 e tem sido a mais utilizada no mundo. É estável, sensível ao eritritol e causa mínimas reações locais e sistêmicas após sua inoculação (ALTON et al., 1988). A dose padrão única tradicionalmente recomendada é 5 x

10^{10} ou 4 a 12×10^{10} células, via subcutânea (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; OMS, 1986; TIMONEY et al., 1988).

Estudos têm demonstrado que a cepa B19 é 65 a 70 % efetiva na proteção contra a maioria dos níveis de exposição a *Brucella*, se utilizada na dose correta e na idade recomendada. Também têm demonstrado que a proteção conferida com a cepa B19 ocorre por pelo menos 5 anos, e provavelmente por toda a vida (PAHO/WHO, 1999). A vacina B19 é atenuada para fêmeas bovinas vacinadas até determinada idade e pode ser perigosa para machos e quaisquer outras espécies incluindo o homem, pela virulência residual que conserva. Os machos vacinados permanecem com títulos vacinais por toda vida, além de haver a possibilidade de desenvolverem orquite (OMS, 1986).

A cepa B19 tem sido usada com resultados flutuantes que vão desde excelente a um baixo nível de proteção. A manutenção de refrigeração durante a distribuição destas vacinas vivas atenuadas é necessária para garantir a sua viabilidade, e a pureza da vacina com relação à semente é essencial para a segurança e potência da vacina (PAHO/WHO, 1999).

A cepa B19, sendo uma cepa de baixa virulência de *B. abortus* biovar 1, produz resposta imunológica idêntica àquela resultante da infecção por uma cepa de campo. Quando os bovinos são vacinados na idade correta (três a oito meses de idade), todos os animais têm o título de anticorpos resultantes diminuído dentro de pouco tempo, geralmente com um ano de idade. Porém, a vacina pode causar títulos sorológicos vacinais persistentes e infecção permanente pela cepa B19 numa pequena porcentagem dos animais vacinados (PAHO/WHO, 1999).

Num experimento realizado por Sutherland et al. (1981), um grupo de bezerras de 3 a 6 meses de idade foi vacinado com a cepa B19. Posteriormente, com 14 a 18 meses de idade todas as novilhas foram cruzadas com touros Poll Shorthorn, e três meses depois foram desafiadas pela conjuntiva com a cepa virulenta S544 de *Brucella abortus*. Das 12 fêmeas

vacinadas, sete ficaram prenhes sendo que uma delas abortou, e do leite de duas cujas crias estavam saudáveis foi isolada *Brucella abortus* logo após o parto. Meyer e Nelson¹ (1969 apud NICOLETTI, 1990), estudando 11 portadoras uterinas da cepa B19, constataram que pelo menos nove culturas de leite destes animais foram positivas por mais de três anos, porém, nenhum organismo foi isolado dos fluídos ou tecidos gerados após a parturição de 8 vacas que deram cria.

A proteção induzida pela vacinação de animais adultos é comparável ou maior que a resposta induzida pela vacinação das novilhas (ALTON; CORNER; PLACKETT, 1980), e tais achados têm levado à vacinação de animais adultos com a dose reduzida da cepa B19 em programas de controle da brucelose, mas, infelizmente, este tipo de vacinação pode levar a títulos sorológicos persistentes, infecções induzidas pela cepa B19 e abortos (GEONG; ROBERTSON, 2000; MEYER, 1985; SANGARI; AGÜERO; GARCÍA-LOBO, 1996).

Segundo Nicoletti (1990), em geral, as vacinas vivas com antígenos de *Brucella* promovem imunidade mais duradoura do que as inativadas, sendo que a bactéria se multiplica no hospedeiro, geralmente por períodos limitados e a resistência conferida é do tipo celular. Os anticorpos têm menor papel na proteção, e numerosos estudos em bovinos têm mostrado baixa relação de anticorpos pós-vacinais circulantes à imunidade subsequente.

¹NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. Florida: CRC Press, 1990. p. 283-299.

1.2.4 Sobre o eritritol

O eritritol ou eritrol é um álcool polihídrico de quatro carbonos, que foi cristalizado a partir do líquido amniótico e alantoideano bovino (PEARCE et al., 1961) e o uso preferencial do eritritol é característica do gênero *Brucella*. Foi reportada a ausência, na B19, de D-eritrose-1-fosfato desidrogenase, uma enzima crítica no mecanismo catabólico do eritritol, sendo que este defeito causa a acumulação do produto tóxico intermediário D-eritrose 1-fosfato e uma depleção dos níveis de ATP, inibindo o crescimento bacteriano (ADAMS, 1990; SANGARI; AGÜERO; GARCÍA-LOBO, 2000). O metabolismo do eritritol é a diferença mais conhecida e mais importante entre a cepa B19 e as cepas virulentas de *B. abortus* (SANGARI; AGÜERO; GARCÍA-LOBO, 2000). Na cepa vacinal B19, um fragmento de 702 pb (pares de base) do gene *ery* apresenta-se deletado e esta seria a explicação para a sua sensibilidade ao eritritol (CORBEL, 1997). Porém, algumas estirpes de B19 são tolerantes ao eritritol e acredita-se que esta seja uma das causas do desenvolvimento de infecção persistente pela mesma, e subsequente abortamento (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; SANGARI et al., 1998).

1.2.5 Situação leiteira no Brasil

De acordo com o Ministério da Agricultura, os rebanhos leiteiros representam 20% do rebanho total, e a produção leiteira está concentrada nas regiões sul e sudeste que representam 69% da produção leiteira nacional (POESTER, 2002).

Segundo Farina et al. (2000), o leite informal tem efeitos perversos sobre a modernização e a competitividade do leite brasileiro porque exacerba o comportamento oportunista e a ruptura de relações contratuais estáveis, amplia as variações de preço típicas da atividade e, por último, agrega a sonegação fiscal. A produção clandestina não tem compromissos com o consumidor, nem com seus fornecedores. Portanto, sua vantagem competitiva está calcada em vantagens de custo advindas de baixos investimentos em controle de qualidade e da sonegação fiscal. Estimando-se o mercado informal, concluíram que corresponderia a algo entre 28 e 29% do total da produção leiteira desde 1997 sendo consumido na forma de leite *in natura*, queijos, doces de leite e outros derivados.

1.2.6 Diagnóstico

A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico baseia-se nos sinais; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, em exames complementares diretos e indiretos.

1.2.6.1 Diagnóstico indireto

A resposta imune dos bovinos a *Brucella abortus* consiste de resposta aguda de IgM, e sua duração depende da via de exposição, dose da bactéria e do estado sanitário do animal.

Quase que imediatamente após a resposta de IgM vem a produção de IgG1 e mais tardiamente, pequenas quantidades de IgG2 e IgA (NIELSEN, 2002). Devido a epítomos comuns presentes na camada lipopolissacarídea (LPS) das brucelas lisas *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, todos os testes sorológicos utilizam o antígeno de *B. abortus* recomendado pelo Manual da OIE, enquanto que as espécies rugosas de *Brucella* são diagnosticadas utilizando antígenos de cada espécie (NIELSEN, 2002).

Com os objetivos de baixar a prevalência e incidência de novos casos de brucelose e de tuberculose, e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário, foi criado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT). Uma das propostas técnicas do Programa é a vacinação de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, entre três e 8 meses de idade, com a amostra B19, única vacina aprovada até então (BRASIL, 2004). A experiência acumulada com esta vacina de uso mais difundido que emprega *B. abortus* atenuada, permite concluir que quando se alcança 80% de cobertura vacinal, a prevalência no rebanho será igual ou inferior a 2%, frequência que permite o incremento das ações de diagnóstico e sacrifício dos animais reatores (ACHA; SZYFRES, 1986; ALTON, 1978; GARCIA-CARRILLO, 1984).

Em propriedades certificadas recomenda-se que as bezerras sejam vacinadas até 6 meses de idade, de forma a minimizar a possibilidade de reações vacinais nos testes sorológicos. A vacinação contra brucelose só pode ser realizada sob responsabilidade de médicos veterinários, que deverão estar cadastrados no serviço oficial de defesa sanitária animal de seu estado de atuação. O PNCEBT é complementado pela certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose ou certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose, assim como o controle do trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais;

o credenciamento e capacitação de médicos veterinários; diagnóstico e apoio laboratorial e a educação sanitária (BRASIL, 2004).

O diagnóstico é parte essencial de um programa e, os métodos diagnósticos indiretos são utilizados para o diagnóstico massal, pesquisando-se principalmente anticorpos no soro e nos fluidos corpóreos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Para a certificação das propriedades foi preconizado pelo PNCEBT o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT) como prova de triagem, baseado no fato da IgG1 bovina ser menos ativa em pH 7, mudando de comportamento com a acidificação do meio. No TAAT, a acidificação da suspensão antigênica a um pH $3,65 \pm 0,05$ aumenta o poder de aglutinação da IgG1 e, além disso, destrói aglutininas inespecíficas e reduz a reatividade da maioria das IgM. É um teste qualitativo rápido, prático e de boa sensibilidade, sendo uma das melhores alternativas para o diagnóstico massal de rebanhos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Entretanto, reações falso negativas podem ocorrer, principalmente devido ao fenômeno de prozona. Além disso, anticorpos resultantes da vacinação por B19 e alguns anticorpos cruzados são detectados por este teste, sendo necessário utilizar outro teste para confirmar os animais reatores como infectados (BRASIL, 2004; NIELSEN, 2002). Para isto, o teste do 2 Mercaptoetanol foi escolhido, pois o teste tem sua especificidade aumentada por um processo químico, que consiste no tratamento do soro com o mercaptoetanol que degrada a IgM em cinco subunidades monoméricas, por redução das pontes dissulfídicas que estabilizam o polímero. Este procedimento impede a ocorrência da maioria das reações inespecíficas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Para se confirmar resultados duvidosos no 2 Mercaptoetanol ou no caso de trânsito internacional, foi preconizada a Reação de Fixação do Complemento (RFC). A técnica baseia-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento e com isso detectar precocemente IgG1 no soro em torno do 14º dia, sendo que as provas de

aglutinação o fazem ao redor do 30º dia. A RFC é também capaz de revelar casos pregressos, em que a IgM já desapareceu e os níveis de IgG1 são baixos, devido ao seu baixo limiar de detecção (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

O PNCEBT também recomenda a utilização do Teste do Anel em Leite para o monitoramento de rebanhos leiteiros. O teste revela anticorpos da classe IgA, presentes no leite e aderidos às moléculas de gordura pela fração Fc. Quando o anticorpo interage com o antígeno corado (hematoxilina ou tetrazólio), forma-se a malha de aglutinação que flutua, junto com a gordura, para a superfície da amostra, revelando o anel colorido (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; NIELSEN, 1995).

1.2.6.2 Diagnóstico direto

A detecção do agente infeccioso seria uma vantagem decisiva sobre os métodos sorológicos, entretanto, de acordo com as propriedades biológicas da *Brucella*, os métodos de cultivo são demorados, podendo falhar quando o nível de infecção for baixo (GALLIEN et al., 1998; MERTZ et al., 2003). Além disso, o isolamento ainda pode apresentar dificuldades pela contaminação dos tecidos fetais por outros microrganismos ou pelo perigo de infecção para os laboratoristas (CORTEZ et al., 2001). O resultado do cultivo depende também de vários fatores incluindo as espécies de *Brucella*, da duração da doença, do método de isolamento e mesmo se houve tratamento antibiótico prévio (MERTZ et al., 2003).

Os métodos diretos são utilizados, na maioria das vezes, nos animais individualizados pelos métodos indiretos e encaminhados para o sacrifício e também nos

casos de abortamento; tendo grande importância na confirmação bacteriológica de foco da doença e a caracterização da estirpe circulante (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido utilizada para a detecção de *Brucella* spp. em diversos substratos (FEKETE; BANTLET; HALLING, 1992; GALLIEN et al., 1998; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; MATAR; KHNEISSER; ABDELNIOOR, 1996; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; ROMERO et al., 1995a; SERPE et al., 1999) por apresentar rapidez de execução, alta sensibilidade e especificidade, possibilidade de processamento de amostras clínicas contaminadas, além de detectar pequenas quantidades de microrganismos que não necessitam estar viáveis (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991). A PCR é um método eficiente e rápido que pode ser usado para a detecção de organismos patogênicos não apenas em animais infectados, mas também em alimentos (GALLIEN et al., 1998).

Baily et al. (1992) descreveram uma PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) desenhados a partir de uma sequência codificante de um antígeno de 31 KDa de *Brucella abortus*, onde aproximadamente 20 células (equivalente a aproximadamente 60 fg de DNA bacteriano) foram detectadas pelo método. Cortez et al. (2001) obtiveram limiar de detecção de 2UFC/mL numa reação de PCR para *Brucella* spp. a partir de conteúdo gástrico e órgãos de fetos abortados. Leal-Klevezas et al. (1995) desenvolveram a PCR para detecção de *Brucella* spp. a partir de sangue e leite de animais infectados, demonstrando a eficiência da técnica para fluidos corpóreos. Romero et al. (1995b) desenvolveram a PCR anteriormente descrita por Romero et al. (1995a) para diagnóstico de brucelose em gado de leite. Foram testadas amostras de leite de vacas infectadas no campo sendo que a sensibilidade e especificidade da técnica foram de 87,5% e 100%, respectivamente. Serpe et al. (1999) desenvolveram um método de PCR gênero-específico para detecção de *Brucella* a partir de queijos mozzarella, pecorino e ricota, detectando produtos até a diluição $1,2 \times 10^5$

UFC. Na tentativa de melhorar a detecção direta de *Brucella* através da PCR, Romero e Lopez-Goñi (1999) testaram diferentes métodos de extração de DNA bacteriano de leite bovino e obtiveram um limiar de detecção de 5 a 50 UFC de *Brucella* / mL de leite. Tantillo et al. (2001) analisaram 46 amostras de queijo de leite de cabra e ovelha, e a PCR detectou a presença de *Brucella* spp. em 46% das amostras de queijo enquanto nenhuma foi positiva pelo método de cultivo.

Análises genéticas de espécies de *Brucella*, incluindo a análise de polimorfismo do genoma, têm mostrado estreita similaridade entre as espécies, o que torna a identificação das espécies difícil. Por causa da pequena variação antigênica entre as espécies de *Brucella*, a diferenciação das espécies e cepas é baseada nas características biológicas e fisiológicas, procedimento trabalhoso e demorado (BRICKER; HALLING, 1994). Devido a essas dificuldades, Bricker e Halling (1994) descreveram um método de PCR, denominado AMOS PCR, que identifica e diferencia a maioria das espécies de *Brucella* e biotipos encontrados nos Estados Unidos. É baseado nas observações de que o elemento genético repetitivo IS 711 é único do gênero *Brucella* e para a maioria das espécies pelo menos uma cópia deste elemento ocorre num locus cromossomal espécie ou biotipo-específico único. Ewalt e Bricker (2000) validaram a AMOS PCR para a diferenciação de *Brucella abortus* em cepa de campo ou vacinal.

Apesar da importância da brucelose bovina, poucos estudos têm sido realizados para a investigação de diferentes biovars de *Brucella* entre os bovídeos no Brasil (POESTER, 2002). A PCR tem sido uma opção promissora para o diagnóstico da brucelose, entretanto, poucos estudos têm sido realizados com amostras de campo para empregar a reação como uma ferramenta de diagnóstico (LEYLA; KADRI; ÜMRAN, 2003).

O trabalho desenvolvido objetivou aplicar a técnica de PCR em produtos lácteos clandestinos na detecção de *Brucella* spp., comparando resultados obtidos pela técnica

molecular com o cultivo microbiológico, além de desenvolver uma reação de PCR eficiente para a diferenciação da espécie *Brucella abortus* em cepa de campo ou B19 em amostras lácteas.

2 OBJETIVOS

- Detectar a presença de *Brucella* spp. em leite e subprodutos lácteos clandestinos através das técnicas de isolamento e da reação em cadeia pela polimerase (PCR).
- Diferenciar a espécie *Brucella abortus* e determinar a sua ocorrência nos materiais positivos para *Brucella* spp. pela reação de PCR.
- Diferenciar as amostras positivas para *Brucella abortus* em cepa vacinal (B19) ou de campo pela reação de PCR.
- Comparação das técnicas de cultivo microbiológico e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *Brucella* spp. pelo índice *Kappa*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE CAMPO

Foram analisadas 300 amostras de produtos lácteos clandestinos provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo e de Minas Gerais. As amostras compradas de locais sem inspeção ou apreendidas nas estradas pelas barreiras volantes realizadas pela Coordenadoria da Defesa Agropecuária foram transportadas sob refrigeração à temperatura máxima de 10°C em sacolas térmicas até o laboratório do TECNOLAT – ITAL, aonde foram registradas, e devidamente acondicionadas para posterior análise microbiológica e molecular da brucelose no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico. Na tabela 1 encontram-se os tipos, quantidade e origem de materiais analisados.

Tabela 1 – Número e tipo de amostras analisadas de acordo com o município e Estado de origem. São Paulo, 2004

ORIGEM	LEITE	QUEIJO FRESCAL	QUEIJO MEIA CURA
MG – Andradas	0	6	0
MG – Araxá	0	2	5
MG – Campestre	0	10	0
MG – Ibitiura	0	10	1
MG – Ipuíuna	0	16	0
MG - Ouro Fino	0	1	0
MG - Patos de Minas	0	0	12
MG - Pouso Alegre	0	4	0
SP – Araçariguama	1	0	0
SP - Araçatuba	4	0	0
SP - Assis	6	5	0
SP - Auriflama	9	0	0
SP – Bernardino de Campos	2	1	0
SP – Campinas	0	16	4
SP - Candido Mota	1	0	0
SP – Chavantes	1	0	0
SP – Dracena	3	0	0
SP – Fartura	1	0	0
SP - Florida Paulista	1	0	0
SP - General Salgado	4	1	1
SP – Ibirarema	1	0	0
SP - Ibiúna	0	25	0
SP – Macaúbal	5	1	0
SP - Marabá Paulista	0	1	0
SP – Mariápolis	1	0	0
SP - Mogi Mirim	0	0	6
SP – Nhandeara	1	0	0
SP – Óleo	1	0	0
SP – Ourinhos	4	3	1
SP – Pacaembu	1	0	0
SP - Paraguaçu Paulista	24	6	0
SP – Piraju	3	1	1
SP - Pres. Venceslau	10	7	3
SP – Quatá	1	0	0
SP - S. Cruz do Rio Pardo	2	0	0
SP - Salto Grande	1	0	0
SP - São Paulo	4	0	0
SP - São Pedro do Turvo	4	2	0
SP - São Roque	1	1	0
SP - Sarutaiá	2	1	0
SP – Sebastianópolis do Sul	0	2	0
SP – Taguaí	1	0	0
SP – Tejuapá	1	0	0
SP – Tupã	5	2	0
SP - Tupi Paulista	1	0	0
SP – Valinhos	1	17	17
TOTAL	108	141	51

3.2 AMOSTRA DE CEPA VACINAL B19

A amostra de *Brucella abortus* cepa vacinal B19 foi gentilmente cedida pelo Laboratório Biovet S/A. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada a partir do cultivo microbiológico da amostra em ágar Brucella sangue (DIFCO) incubado a 37° C durante dez dias sob atmosfera de 5 % de CO₂. A amostra foi utilizada na infecção experimental de leite e queijo para determinação da sensibilidade analítica das técnicas de PCR.

3.3 AMOSTRAS DE *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* e *B. melitensis*

As amostras de *Brucella abortus* estirpe 544 (biovar 1), *B. suis* 1330 (biovar 1), *B. canis* LM 6/66, *B. ovis* 63/290 (biovar 1), *B. melitensis* 16 M (biovar 1) e *B. neotomae* 5k33 (biovar 1) provenientes do Center for Diseases Control (CDC) e cedidas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, foram empregadas para a confirmação da especificidade dos “primers”.

3.4 AMOSTRA DE CEPA VACINAL RB51

Uma amostra da vacina RB51 de *Brucella abortus* gentilmente cedida pela empresa Fort Dodge Saúde Animal, produzida no México, foi empregada para a confirmação da especificidade dos “primers”.

3.5 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

As amostras de leite mantidas a 4° C em tubo de polipropileno de 14 mL foram homogeneizadas em vórtex, e o volume de 10 µL foi semeado em ágar Brucella (DIFCO) acrescido de 10 % de sangue desfibrinado de carneiro com e sem a adição de uma mistura antibiótica composta de 10.000 UI/L de polimixina B, 15.000 UI/L de bacitracina, 0,005g/L de novobiocina e 0,02g/L de cicloheximida. As placas foram incubadas sob microaerofilia (85% de N₂, 10% de O₂ e 5% de CO₂) e aerobiose, a 37 °C por até 10 dias (GENOVEZ et al., 1993).

De cada amostra de queijo, 25g foram suspensos em 100 mL de caldo Brucella (DIFCO), homogeneizadas em Stomacher 80 (Lab System®) e decantadas por alguns segundos. A partir de 10µL do sobrenadante foi feita a semeadura conforme descrito acima para as amostras de leite.

As culturas suspeitas foram identificadas segundo Carter e Chengappa (1991) e Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Ao serem recebidas no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico, as amostras de campo foram preparadas para o procedimento de extração de DNA.

3.6.1 Leite

As amostras de leite foram transferidas, sem qualquer tratamento, para tubos de polipropileno de 14mL e conservadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.6.2 Queijo minas frescal e meia-cura

Uma alíquota do sobrenadante dos queijos homogeneizados utilizados nos cultivos em caldo Brucella (DIFCO) foi transferida para um microtubo de 1500 μL e estocado a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA

As alíquotas das amostras de campo foram descongeladas para o procedimento de extração de DNA. As cepas padrão de *Brucella* spp. foram cultivadas em ágar Brucella (DIFCO) acrescido de 10 % de sangue desfibrinado de carneiro e as colônias mantidas a – 80°C em meio contendo glicerol a partir do qual procedeu-se a extração de DNA para comprovação de especificidade dos “primers”.

3.7.1 Protocolo de extração do DNA com o reagente comercial DNAzol (Invitrogen®), adaptado de Chomczynski (1993)

- Adicionar 100 µL da amostra (leite previamente homogeneizado e sobrenadante resultante da decantação da amostra de queijo) em 1 mL de DNAzol
- Homogeneizar por inversão e centrifugar a 10 000 x g / 10 min.
- Descartar o sobrenadante
- Adicionar ao pellet, 500 µL de etanol puro
- Homogeneizar por inversão até a precipitação do DNA
- Centrifugar a 4000 x g / 2min.
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Adicionar ao pellet, 850 µL de etanol 75%
- Centrifugar a 4000 x g / 2min.
- Descartar o sobrenadante por inversão

- Adicionar ao pellet, 850 μL de etanol 75%
- Centrifugar a 4000 x g/ 2min.
- Retirar todo o etanol com a pipeta e aguardar aproximadamente 20 segundos para evaporar o restante
- Ressuspender o pellet em 100 μL de NaOH 8 mM
- Neutralizar o pH com aproximadamente 50 μL de Hepes 1 M
- Estocar a -20°C

3.7.2 Protocolo de extração de DNA por fervura

Este protocolo foi utilizado para extração de DNA das amostras dos itens 3.2, 3.3 e 3.4, que estavam sendo mantidas a -80°C em meio contendo glicerol. A reação foi realizada em microtubos de 1500 μL .

- Adicionar 400 μL de TE em microtubo
- Adicionar ao microtubo, 200 μL da amostra no meio com glicerol
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 13000 x g/ 10 minutos
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 200 μL de TE
- Centrifugar a 13000 x g/ 2 minutos e utilizar o sobrenadante

3.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A partir do DNA extraído das amostras foram realizadas as reações de PCR.

3.8.1 “Primers” empregados para a detecção de DNA de *Brucella* spp.

A técnica de PCR para brucelose foi realizada a partir do DNA extraído empregando-se o par de "primers" gênero-específico B4 e B5 descritos por Baily et al. (1992), que amplificam fragmentos de 223 pb referentes a um gene que codifica uma proteína imunogênica de 31 KDa, e cujas seqüências encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção de *Brucella* spp.

“PRIMERS”		SEQÜÊNCIA	
B ₄	5´	TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA	3´
B ₅	5´	GTC TGG ACT TTC CGT TCG CGC	3´

A amplificação das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cortez et al. (2001):

- 15 µl de água ultrapura (Millipore)
- 5 µl de tampão de reação 10 X (500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, ph 9,0)
- 8 µl da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP])
- 1,5 µl de MgCl₂ a 1,5 mM

- 5 µl do “primer” B₄ (10pmol/µl)
- 5 µl do “primer” B₅ (10pmol/µl)
- 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por µl)
- 10 µl da amostra de DNA extraído

Anteriormente ao ciclo de temperaturas procedeu-se a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, ao final, uma extensão a 72°C por 10 minutos. Foram empregados 40 ciclos, divididos em três fases: desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 60°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

3.8.2 “Primers” empregados para a detecção de DNA de *Brucella abortus*

A técnica de PCR para *Brucella abortus* foi realizada a partir do DNA extraído das amostras positivas na PCR para *Brucella* spp., empregando-se um par de “primers” espécie-específico: a) “primer” específico de *Brucella abortus* (BAB) e b) “primer” específico do elemento IS 711 (IS 711), descritos por Bricker e Halling (1994), que amplificam fragmentos de 498 pb e cujas seqüências estão contidas na tabela 3. No esquema 1 está representada a hibridização dos “primers” BAB e IS711 no genoma da *Brucella abortus* biovars 1, 2 e 4.

Tabela 3 - Sequência dos “primers” utilizados na PCR para identificação de *Brucella abortus*

“PRIMERS”	SEQÜÊNCIA		
BAB	5´	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC	3´
IS 711	5´	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	3´

Esquema 1 – Representação da hibridização dos “primers” específicos para *Brucella abortus* biovars 1, 2, e 4 e tamanho do fragmento amplificado

A amplificação das amostras foi modificada em relação ao publicado por Bricker e Halling (1994), tendo sido empregado o reagente Master Mix da Eppendorf®, conforme:

- 14 µl de água ultrapura (Millipore)
- 20 µl de Master Mix (50 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, 1,5 mM Mg²⁺, 200 µM de cada dNTP e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase)
- 3 µl de BAB (a 10 pmol / µL)
- 3 µl de IS 711 (a 10 pmol / µL)
- 10 µl de DNA

Anteriormente ao ciclo de temperaturas procedeu-se a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, ao final, a extensão a 72°C por 5 minutos. Foram empregados 40 ciclos, divididos

em três fases: desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos.

3.8.3 “Primers” empregados para o diferencial da origem da cepa de *Brucella abortus* em campo ou vacinal (B19)

A técnica de PCR para diferenciação da origem da cepa foi realizada a partir do DNA extraído das amostras positivas na PCR para *Brucella abortus*, empregando-se os "primers" *eri 1* e *eri 2* descritos por Sangari, García-Lobo e Agüero (1994). Foi também utilizado o “primer” oligo 1, neste trabalho denominado como *eri 3*, descrito por Bricker e Halling (1995) juntamente com o *eri 1* numa reação de hemi-nested PCR para aumentar a sensibilidade da reação caso a primeira não permita a visualização de banda para diferenciar a origem da cepa.

Tabela 4 - Sequência dos “primers” utilizados para diferenciação da origem da cepa de *Brucella abortus* em campo ou vacinal (B19)

“PRIMERS”		SEQÜÊNCIA	
<i>eri 1</i>	5´	GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA	3´
<i>eri 2</i>	5´	CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA	3´
<i>eri 3</i>	5´	TTG GCG GCA AGT CCG TCG GT	3´

A amplificação das amostras foi padronizada, utilizando-se o reagente Master Mix da Eppendorf®.

- 14 µl de água ultrapura (Millipore)
- 20 µl de Master Mix (50 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, 1,5 mM Mg²⁺, 200 µM de cada dNTP e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase)
- 3 µl de *eri* 1 (a 10 pmol / µL)
- 3 µl de *eri* 2 (PCR) ou *eri* 3 (nested PCR) (a 10 pmol / µL)
- 10 µl de DNA

Tanto na PCR como na reação de nested PCR, anteriormente ao ciclo de temperaturas empregado procedeu-se a desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos e, ao final, a extensão a 72°C por 10 minutos. Na primeira reação foram empregados 35 ciclos divididos em três fases: desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 57°C por 120 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos.

Na reação de nested PCR foram empregados 30 ciclos: desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 59° C por 60 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos.

No esquema 2 está representada a hibridização dos “primers” *eri* 1 e *eri* 2 com o genoma de cepa de *Brucella* spp., destacando-se a deleção genética de 702 pares de base (pb) existente na cepa vacinal B19, e o tamanho dos produtos amplificados.

Esquema 2 – Representação da hibridização dos “primers” *eri* 1 e *eri* 2 no genoma de *Brucella* spp., destacando-se a deleção genética existente na B19, e o tamanho dos produtos amplificados

Nas amostras que não revelaram banda nesta reação, foi realizada a reação de hemi-nested PCR. Para as amostras de *Brucella* spp. exceto a cepa vacinal B19, na hemi-nested PCR, a fita de DNA alvo é o fragmento de 1063 pb amplificado na primeira PCR, cujo sinal não foi possível de ser visualizado. No esquema 3 está representada a hibridização dos “primers” da hemi-nested PCR para cepas de *Brucella* spp., exceto a B19.

Esquema 3 - Representação da hibridização dos “primers” utilizados na nested PCR nas cepas de *Brucella* spp., exceto cepa vacinal B19, e tamanho do produto amplificado

Para as amostras vacinais (B19), na hemi-nested PCR, a fita de DNA alvo é o fragmento de 361 pb amplificado na primeira PCR. Devido a deleção genética da B19, o “primer” *eri 3* não se hibridiza em nenhum locus da fita alvo. Porém, como esta fita tem pequena extensão, e o “primer” *eri 1* se hibridiza à fita, a *Taq* DNA polimerase consegue estender todo o fragmento, podendo revelar o fragmento não visualizado na primeira reação. Esquematizando-se, a hibridização dos “primers” ocorre conforme modelo a seguir:

OBS: $a + b = 361 \text{ pb}$

Esquema 4 – Representação da hibridização do “primer” *eri 1* na nested-PCR em cepa vacinal B19, e tamanho do produto amplificado

3.8.4 Comprovação da especificidade dos “primers”

As amostras de *Brucella abortus* estirpe 544, *Brucella abortus* cepa vacinal B19, *Brucella abortus* cepa vacinal RB51, *Brucella suis* estirpe 1330, *Brucella canis* estirpe M 6/66, *Brucella ovis* estirpe 63/290, *Brucella neotomae* estirpe 5K 33 e *Brucella melitensis* estirpe 16M foram testadas para os seguintes “primers” para comprovação da sua especificidade:

- B₄ e B₅, descritos por Baily et al. (1992);
- BAB e IS 711, descritos por Bricker e Halling (1994);
- *eri 1* e *eri 2* descritos por Sangari, García-Lobo e Agüero (1994) e *eri 3* descrito por Bricker e Halling (1995) na reação de hemi-nested PCR.

O DNA das amostras foi extraído como descrito no item 3.7.2.

3.8.5 Avaliação do limiar de detecção da técnica de PCR nas amostras de leite e queijo experimentalmente contaminadas com diferentes concentrações de *Brucella abortus* cepa vacinal B19 e cepa de campo

A avaliação do limiar de detecção da técnica de PCR foi realizada a partir de uma amostra de leite e outra de queijo, ambas negativas tanto para a PCR quanto para o cultivo microbiológico. Os limiares de detecção da reação de PCR foram obtidos pela contaminação experimental destas amostras com 1 UFC/mL até a diluição seriada 10^{-10} UFC/mL, pela cepa vacinal B19 e cepa de campo de *Brucella abortus*. A extração de DNA e as amplificações foram feitas como descrito nos itens 3.7.2, 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3.

3.8.6 Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,3 % com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/ cm. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1 D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.9 CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS TÉCNICAS DE PCR E CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA *Brucella* spp.

A concordância entre o cultivo microbiológico para *Brucella* spp. e PCR foi obtida através do indicador *Kappa* (THRUSFIELD, 1995).

4 RESULTADOS

- Nas figuras 1 e 2 estão apresentados os resultados da comprovação da gênero especificidade dos “primers” descritos por Baily et al. (1992) e os resultados da comprovação da espécie especificidade dos “primers” descritos por Bricker e Halling (1994), respectivamente. Nas figuras 3 e 4 estão apresentados os resultados da comprovação da especificidade dos “primers” usados para diferenciação das cepas de campo e vacinal (B19) descritos por Sangari, García-Lobo e Agüero (1994) e Bricker e Halling (1995).

Figura 1 - Aplicação da técnica de PCR com os “primers” gênero específicos para *Brucella* spp. descritos por Baily et al. (1992), utilizando extração de DNA por fervura - São Paulo - 2004

- (1) Padrão molecular 100 bp;
- (2) *Brucella abortus* estirpe 544;
- (3) *Brucella abortus* cepa vacinal B19;
- (4) *Brucella abortus* cepa vacinal RB51;
- (5) *Brucella suis* estirpe 1330 (biovar 1);
- (6) *Brucella canis* estirpe LM 6/66;
- (7) *Brucella ovis* estirpe 63/290 (biovar 1);
- (8) *Brucella melitensis* estirpe 16M (biovar 1);
- (9) *Brucella neotomae* estirpe 5k33 (biovar 1);
- (10) controle negativo.

Figura 2 - Aplicação da técnica de PCR com os “primers” específicos para *Brucella abortus* descritos por Bricker e Halling (1994), utilizando extração de DNA por fervura - São Paulo - 2004

- (1) Padrão molecular 100 bp;
- (2) *Brucella abortus* estirpe 544;
- (3) *Brucella abortus* cepa vacinal B19;
- (4) *Brucella abortus* cepa vacinal RB51;
- (5) *Brucella suis* estirpe 1330 (biovar 1);
- (6) *Brucella canis* estirpe LM 6/66;
- (7) *Brucella ovis* estirpe 63/290 (biovar 1);
- (8) *Brucella melitensis* estirpe 16M (biovar 1);
- (9) *Brucella neotomae* estirpe 5k33 (biovar 1);
- (10) controle negativo.

Figura 3 - Aplicação da técnica de PCR com os “primers” descritos por Sangari, García-Lobo e Agüero (1994) que amplificam fragmento de 1063 pb em amostras de *Brucella abortus* 544, amostra vacinal de *B. abortus* RB51, *B. suis* 1330 (biovar 1), *B. canis* LM 6/66, *B. ovis* 63/290 (biovar 1), *B. melitensis* 16 M (biovar 1), *B. neotomae* 5k 33 (biovar 1), e 361 pb em amostra de cepa vacinal B19 de *Brucella abortus*, utilizando extração de DNA por fervura - São Paulo - 2004

- (1) Padrão molecular 100 bp;
- (2) *Brucella abortus* estirpe 544;
- (3) *Brucella abortus* cepa vacinal B19;
- (4) *Brucella abortus* cepa vacinal RB51;
- (5) *Brucella suis* estirpe 1330 (biovar 1);
- (6) *Brucella canis* estirpe LM 6/66;
- (7) *Brucella ovis* estirpe 63/290 (biovar 1);
- (8) *Brucella melitensis* estirpe 16M (biovar 1);
- (9) *Brucella neotomae* estirpe 5k33 (biovar 1);
- (10) controle negativo.

Figura 4 - Aplicação da técnica de hemi-nested PCR com o “primer” *eri* 1 descrito por Sangari, García-Lobo e Agüero (1994) e o “primer” *eri* 3 descrito por Bricker e Halling (1995) que amplificam fragmento de 240 pb em amostras de *Brucella abortus* 544, amostra vacinal de *B. abortus* RB51, *B. suis* 1330 (biovar 1), *B. canis* LM 6/66, *B. ovis* 63/290 (biovar 1), *B. melitensis* 16 M (biovar 1), *B. neotomae* 5k 33 (biovar 1), e 361 pb em amostra de cepa vacinal B19 de *Brucella abortus*, utilizando extração de DNA por fervura - São Paulo - 2004

- As figuras 5 a 16 apresentam os resultados do limiar de detecção das técnicas de PCR, e os resultados estão sumarizados na tabela 5.

Figura 5 – Técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY et al., 1992) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa vacinal B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 6 – Técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY et al., 1992) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa vacinal B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 7 – Técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY et al., 1992) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 8 – Técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY et al., 1992) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 9 – Técnica de PCR com os “primers” BAB e IS 711 (BRICKER; HALLING, 1994) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa vacinal B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 10 – Técnica de PCR com os “primers” BAB e IS 711 (BRICKER; HALLING, 1994) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa vacinal B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 11 – Técnica de PCR com os “primers” BAB e IS 711 (BRICKER; HALLING, 1994) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 12– Técnica de PCR com os “primers” BAB e IS 711 (BRICKER; HALLING, 1994) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 13 – Técnica de PCR com os “primers” *eri* 1e *eri* 2 (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) e nested-PCR com os “primers” *eri* 1 e *eri* 3 (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 14 - Técnica de PCR com os “primers” *eri* 1e *eri* 2 (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) e nested-PCR com os “primers” *eri* 1 e *eri* 3 (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa B19, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 15 - Técnica de PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 2* (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) e nested-PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 3* (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada ao queijo experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Figura 16 - Técnica de PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 2* (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) e nested-PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 3* (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada ao leite experimentalmente contaminado com cepa de campo de *Brucella abortus*, cuja extração de DNA foi obtida a partir do DNAzol - São Paulo - 2004

Tabela 5 – Resumo dos limiares de detecção pela técnica de PCR com os “primers” utilizados no estudo, obtidos a partir de queijo e leite experimentalmente contaminados com B19 e cepa de *Brucella abortus* de campo, em diluições seriadas de 10^0 UFC / mL até 10^{-10} UFC / mL - São Paulo - 2004

PRIMERS AMOSTRA	B ₄ e B ₅	BAB e IS711	eri 1 e eri2	eri 1 e eri 3
Queijo (B19)	10^{-6} UFC/mL	10^{-5} UFC/mL	10^{-4} UFC/mL	10^{-10} UFC/mL
Leite (B19)	10^{-5} UFC/mL	10^{-5} UFC/mL	10^{-3} UFC/mL	10^{-5} UFC/mL
Queijo (campo)	10^{-7} UFC/mL	10^{-6} UFC/mL	10^{-3} UFC/mL	10^{-10} UFC/mL
Leite (campo)	10^{-5} UFC/mL	10^{-5} UFC/mL	10^{-3} UFC/mL	10^{-6} UFC/mL

- No quadro 1 encontra-se a classificação das amostras analisadas pela técnica de PCR e pelo cultivo microbiológico. Pelos resultados, calculou-se o índice de concordância Kappa (THRUSFIELD, 1995).

Cultivo Micr. PCR	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0 (a)	37 (b)	37
Negativo	0 (c)	263 (d)	263
Total	0	300	300

Quadro 1 – Classificação das amostras analisadas pela técnica de PCR e pelo cultivo microbiológico - São Paulo - 2004

Cálculo de *Kappa*:

$$K = PO - PE / 1 - PE$$

onde:

PO = proporção de concordância observada

PE = proporção de concordância aleatória esperada

$$PO = (a + d) / (a + b + c + d)$$

$$PE = [(a + b) / n \times \{(a + c) / n\}] + [(c + d) / n \times \{(b + d) / n\}]$$

Então:

$$K = 0,8766 - 0,8766 / 1 - 0,8766$$

$$K = 0$$

Tabela 6 – Interpretação do *Kappa*, segundo Thrusfield (1995)

<i>Kappa</i>	Concordância
0	baixa
0 – 0,20	fraca
0,21 – 0,40	razoável
0,41 – 0,60	moderada
0,61 – 0,80	substancial
> 0,81	quase perfeita

- As 300 amostras pesquisadas foram negativas no cultivo bacteriológico para *Brucella* spp., com grande contaminação bacteriana de outros gêneros. Na PCR para detecção de DNA de *Brucella* spp., 37 amostras (12,33%) de queijo foram positivas. Destas, nenhum leite dos 108 analisados foi positivo, 29/141 (20,56%) dos queijos minas frescal e 8/51 (15,68%) queijos minas meia-cura foram positivos. Das amostras provenientes de São Paulo, 10,3 % (24/233) foram positivas para *Brucella* spp. e, das amostras de Minas Gerais, 19,4 % (13/67) foram positivas para *Brucella* spp.
- Todas as 37 amostras (100%) positivas para *Brucella* spp. foram diagnosticadas como sendo da espécie *Brucella abortus* pela PCR, resultado ilustrado na tabela 2.
- Das 37 amostras positivas para *Brucella abortus*, 30 (81,08%) foram determinadas como sendo de origem vacinal (B19) e sete (18,92 %) como sendo cepa de campo. Na tabela 2 estão apresentadas as amostras positivas para *Brucella* spp., e os resultados das reações de PCR com “primers” específicos para *Brucella abortus* e com “primers” para diferenciação da origem da cepa.
- No gráfico 1 está representada a amostragem de acordo com o município e os resultados da diferenciação da cepa. Na figura 17 a amostragem e os resultados positivos para *Brucella abortus* estão representados geograficamente.

Tabela 7 – Resultados da reação de PCR para determinação da espécie *Brucella abortus* e de hemi-nested PCR (*eri* 1 e 2; e *eri* 1 e 3) para diferenciação da origem da cepa - São Paulo - 2004

Amostra	Tipo	Origem	PCR				Conclusão
			<i>Brucella</i> spp.	<i>Brucella abortus</i>	<i>eri</i> 1 e 2	<i>eri</i> 1 e 3	
Q267	qf	MG - Andradas	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q270	qf	MG - Andradas	positivo	positivo	361 pb		B19
Q265	qf	MG - Campestre	positivo	positivo	negativo	240 pb	Campo
Q291	qf	MG - Campestre	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q268	qf	MG - Campestre	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q238	qf	MG - Ipiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q269	qf	MG - Ipiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q94	qf	MG - Ouro Fino	positivo	positivo	361 pb		B19
Q15	qmc	MG - Patos de Minas	positivo	positivo	negativo	240 pb	Campo
Q211	qmc	MG - Patos de Minas	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q39	qf	MG - Pouso Alegre	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q40	qf	MG - Pouso Alegre	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q6	qf	MG - Pouso Alegre	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q235	qf	SP - Campinas	positivo	positivo	361 pb		B19
Q18	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	361 pb		B19
Q21	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q50	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	1063 pb		Campo
Q16	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q19	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q22	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q44	qf	SP - Ibiúna	positivo	positivo	361 pb		B19
Q121	qf	SP - Paraguaçu Pta.	positivo	positivo	361 pb		B19
Q123	qf	SP - Paraguaçu Pta.	positivo	positivo	negativo	240 pb	Campo
Q182	qf	SP - Sebastianópolis do Sul	positivo	positivo	1063 pb		Campo
Q190	qf	SP - Tupã	positivo	positivo	361 pb		B19
Q1	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	240 pb	Campo
Q13	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19
Q24	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q28	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q30	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19
Q4	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	240 pb	Campo
Q47	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q51	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	negativo	361 pb	B19
Q54	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19
Q55	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19
Q59	qmc	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19
Q9	qf	SP - Valinhos	positivo	positivo	361 pb		B19

Legenda da Tabela 4 - qmc = queijo minas meia-cura; qf= queijo minas frescal

Gráfico 1 – Número de amostras analisadas de acordo com o município, e amostras positivas na PCR de diferenciação da cepa para *Brucella abortus* campo e B19. São Paulo, 2004

- Negativo para *Brucella abortus*
- Positivo para *Brucella abortus*

Figura 17 – Localização geográfica da coleta das amostras e resultados positivos para *Brucella abortus* por município - São Paulo - 2004

5 DISCUSSÃO

A análise das figuras 1, 2, 3 e 4 demonstraram que os “primers” utilizados no trabalho tiveram sua especificidade confirmada: B₄ e B₅ (BAILY et al., 1992) amplificaram fragmento de 223 pb nas seis espécies de *Brucella* testadas e nas cepas vacinais B19 e RB51, comprovando sua gênero especificidade; BAB e IS 711 (BRICKER; HALLING, 1994) amplificaram fragmento de 498 pb apenas na estirpe 544 de *Brucella abortus* e nas cepas vacinais B19 e RB51 de *Brucella abortus*; *eri* 1 e *eri* 2 (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) amplificaram fragmento de 1063 pb nas cepas de campo e cepa vacinal RB51 e de 361 pb na B19; e *eri* 1 (SANGARI; GARCÍA-LOBO; AGÜERO, 1994) e *eri* 3 (BRICKER; HALLING, 1995) amplificaram fragmento de 240 pb na hemi-nested PCR nas cepas de campo e vacinal RB51, e de 361 pb na cepa vacinal B19.

A extração de DNA tanto de leite como de queijo com o reagente comercial DNAzol (Invitrogen ®) mostrou-se muito eficiente, além de ser uma metodologia prática e fácil, promovendo a extração de DNA em menos de uma hora. Este protocolo de extração promoveu ótima sensibilidade analítica da reação de PCR para detecção de *Brucella* spp., permitindo que diminutas quantidades do microrganismo fossem detectadas diretamente na amostra clínica. Além disso, a utilização do DNAzol juntamente com a otimização das reações de PCR utilizando-se o Master Mix (Eppendorf ®) e mudança dos ciclos de temperatura para a amplificação de DNA no caso das reações de PCR para *Brucella abortus* e para diferenciação da cepa, promoveram um baixo limiar de detecção das provas. Na tabela 5 observa-se a alta sensibilidade analítica das reações, e a proximidade dos limiares de detecção obtidos pelas reações gênero e espécie específicas, tanto para leite quanto para queijo experimentalmente contaminados com B19 e *Brucella abortus* de campo. A reação de

diferenciação da origem da cepa com os “primers” *eri 1* e *eri 2* teve limiar de detecção aproximadamente 100 vezes maior do que as reações anteriormente citadas, tendo sido padronizada a reação de hemi-nested PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 3*, permitindo que 22 amostras (59,45%) tivessem a cepa diferenciada. O DNA extraído das amostras com DNazol foi mantido por alguns meses a -20°C até que a reação para diferenciação da cepa fosse padronizada, podendo ter ocorrido perda de material genético de alguns materiais, o que também justificaria a necessidade da hemi-nested PCR.

Bricker e Halling (1995) descreveram uma reação de PCR para a diferenciação da B19, com o “primer” *eri 3* utilizado neste trabalho, que se hibridiza dentro da deleção de 702 pb existente na B19, e outro “primer” que se hibridiza fora da deleção, amplificando um fragmento de 178 pb em todas as cepas de *Brucella* spp. exceto na B19. Esta reação foi testada neste estudo, porém, a ausência de visualização de fragmento de DNA deixava dúvidas quanto a confirmação da B19 ou a falta de sensibilidade da reação. Portanto, a PCR proposta com os “primers” *eri 1* e *eri 2* tem a vantagem de sempre amplificar um fragmento de DNA, tanto no caso de *Brucella* spp. de campo quanto nas cepas vacinais B19 e RB51. E, nos casos em que esta reação não for sensível o suficiente, a hemi-nested PCR com os “primers” *eri 1* e *eri 3* permitirá a diferenciação da estirpe.

As reações de PCR com os “primers” BAB e IS 711, e *eri 1* e *eri 2* tiveram seus protocolos originais de amplificação modificados para otimizar as mesmas, adaptando-se às condições do laboratório e ao tipo de amostra analisada, permitindo um resultado específico que não deixasse dúvidas à sua avaliação.

No presente trabalho foram analisadas 300 amostras lácteas: 108 amostras de leite cru e 192 amostras de queijo, sendo 141 amostras de queijo frescal e 51 de queijos meia-cura. Foi constatado que entre as 300 amostras consideradas negativas pelo cultivo microbiológico para *Brucella* spp., a PCR detectou a presença de DNA de *Brucella* em 29 (20,56 %) amostras de

queijo fresco e em 8 (15,69 %) amostras de queijo meia-cura, sendo que nenhuma amostra de leite mostrou-se positiva na PCR. Pelo índice *Kappa*, a concordância entre as técnicas é baixa, provavelmente devido às diferenças existentes entre as técnicas: enquanto o cultivo microbiológico depende da viabilidade do microrganismo, da qualidade da amostra analisada e do tempo transcorrido entre a coleta e o seu processamento, a detecção de DNA pela PCR não depende destes fatores, podendo o microrganismo estar inviável, a amostra contaminada com outros microrganismos e mesmo se houver demora no processamento do material.

A concordância baixa entre as técnicas de PCR e cultivo microbiológico encontrada neste estudo difere da boa concordância relatada por Cortez et al. (2001) com amostras clínicas de fetos bovinos abortados utilizando os “primers” B₄ e B₅, e a ótima concordância entre as técnicas para detecção de *Brucella melitensis* descrita por Leyla, Kadri e Ümran (2003) a partir de amostras de fetos ovinos abortados com “primers” distintos. Serpe et al. (1999) descreveram um método de rápida detecção de *Brucella* spp. em queijo fresco por PCR utilizando os “primers” BRU-UP e BRU-LOW em amostras processadas a partir de leite bovino e bubalino coletadas nas regiões de Campânia e Calábria, obtendo limiar de detecção de $1,2 \times 10^5$ UFC / 10 g de queijo. Utilizando os mesmos “primers” anteriores, Tantillo et al. (2001) pesquisaram a presença de *Brucella* spp. em 46 amostras de queijo (de origem ovina e caprina) através do cultivo microbiológico e PCR. No cultivo, nenhuma amostra foi positiva, enquanto que na PCR, 46% das amostras de queijo mostraram-se positivas. Segundos os autores, a sensibilidade e especificidade da PCR sugerem que este seja um procedimento alternativo adequado e confiável para a rotina de triagem e monitoramento microbiológico, embora não seja capaz de discriminar células viáveis e não viáveis. Leal-Klevezas et al. (1995), utilizando os “primers” JPF e JPR para detecção de DNA de *Brucella* spp., pesquisaram 17 amostras de leite caprino, e 11 delas foram positivas na PCR. Num outro grupo, composto de 15 cabras sorologicamente negativas para *Brucella* spp., foi detectada a

presença do DNA de *Brucella* spp. no leite de 2 animais. Em outro grupo de três cabras, sabidamente infectadas através de provas sorológicas e isolamento bacteriano, foi confirmada a presença do microrganismo por PCR.

A detecção de *Brucella* spp. apenas em amostras de queijo, e não de leite, provavelmente seja devido à diluição do leite proveniente de vários animais diferentes, além do acréscimo de outros diluentes, para então este ser comercializado, enquanto que para a produção de 1 kg queijo são necessários aproximadamente 10 litros de leite. Fabian¹ (1947 apud KEOGH, 1971) pesquisou surtos de doenças ligadas ao consumo de queijo infectado de muitas variedades, sendo que *Staphylococcus* patogênico, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, várias outras espécies de *Salmonella* e *Brucella* spp. foram os patógenos responsáveis mais comuns. Segundo Poester (2002), deve-se atentar para o fato de que o consumo de queijo é muito grande no Brasil, tanto na área urbana como na rural, e que, o consumo de queijo fresco não pasteurizado é muito comum, sendo uma fonte provável de infecção para o homem.

A B19 foi a primeira vacina efetiva contra brucelose, produzida a partir da cepa 19 de *Brucella abortus* atenuada. Posteriormente, foi desenvolvida a 45/20, vacina viva rugosa de *Brucella abortus*, para tentar driblar a interferência dos anticorpos vacinais da B19 nos testes de diagnóstico, porém, houve reversão da virulência “in vivo”. O uso de células mortas desta cepa com adjuvante obteve sucesso moderado, mas a variação de algumas propriedades da vacina de lote para lote limitou sua aplicação. Este problema foi solucionado com o desenvolvimento da vacina RB51, cepa mutante de *Brucella abortus* resistente a rifampicina. Esta é uma mutante rugosa, com ausência da cadeia O, não induzindo, portanto, a produção de anticorpos contra esta cadeia detectados pelos testes sorológicos usados no diagnóstico da brucelose, apesar da idade, dose ou frequência de aplicações (SCHURIG; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

¹KEOGH, B. P. Reviews of the progress of dairy science. **Journal of Dairy Research**, v. 38, p. 91-110, 1971.

A RB51 é a cepa vacinal oficial utilizada nos Estados Unidos da América (EUA) e no México. Nos EUA, a vacinação de fêmeas prenhes só pode ser realizada sob autorização. No México, ela é feita com doses reduzidas de RB51, assim como anteriormente a B19 era usada para vacinar animais adultos, prenhes ou não. Para manter a efetividade da vacina, geralmente animais adultos são revacinados, embora isso possa levar a efeitos indesejáveis como excreção do agente ou aborto (ARELLANO-REYNOSO et al., 2004).

Neste trabalho, com as reações utilizadas, o perfil obtido pelas cepas de *Brucella abortus* de campo é o mesmo da RB51 (como observado nas figuras 1, 2, 3 e 4), sendo necessária outra reação de PCR com outros “primers” para sua diferenciação. Porém, pelo PNCEBT, apenas a vacina B19 é permitida em território nacional, não tendo sido pesquisada, portanto, a cepa RB51.

A prova “padrão ouro” para brucelose continua sendo o isolamento de colônias bacterianas “suspeitas” de tecido do hospedeiro, leite ou exsudato vaginal, seguido da caracterização bacteriológica. Este processo tem resistido ao tempo por ser confiável e geralmente definitivo, porém, tem desvantagens. Primeiro, o longo período necessário para a identificação definitiva dura geralmente duas semanas; durante o qual o produtor, o processador de alimentos ou o paciente doente pode estar sujeito à privação desnecessária se a suspeita não for comprovada. Segundo, os testes são complexos e devem ser realizados em laboratório autorizado por pessoal altamente habilitado. Algumas das características são subjetivas, tais como morfologia da colônia, requerendo experiência de um profissional treinado. Terceiro, a natureza zoonótica da maioria das espécies de *Brucella* se configura em perigo potencial para o pessoal do laboratório que deve manipular o agente infeccioso durante os testes. Finalmente, os resultados não são sempre definitivos. Por causa do grande número de testes necessários e do pequeno número de diferenças entre algumas espécies e biovars,

uma pequena mutação pode resultar num dado conflitante e complicar a interpretação (BRICKER, 2002).

Poucos laboratórios têm desenvolvido protocolos de PCR para queijo e outros produtos leiteiros. Apesar da presença de qualquer espécie de *Brucella* em produtos alimentícios ser inaceitável, apenas alguns protocolos gênero específicos foram descritos (HAMDY; AMIN, 2002; LEAL-KLEVEZES et al., 1995; SERPE et al., 1999; TANTILLO et al., 2001). Segundo Bricker (2002), é preciso maior atenção para detectar *Brucella* spp. em alimentos, além de mais pesquisas em áreas de subtipagem molecular para rastreamento epidemiológico ou para programas de erradicação espécie-específicos, e análise direta de amostras clínicas, salientando a importância do trabalho desenvolvido.

A PCR permitiu a verificação da presença do DNA bacteriano em 12,33% das amostras (37/300), contudo, a viabilidade do agente não foi constatada devido à ausência de isolamento de *Brucella* spp nestas amostras. Porém, é importante ressaltar que o gênero *Brucella* é composto por microrganismos fastidiosos, sensíveis a variações de pH ou outras adversidades do meio (CARTER; CHENGAPPA, 1991; TANTILLO et al., 2001), e que os materiais encontravam-se contaminados por outros gêneros bacterianos.

Sendo assim, a técnica de PCR representa um importante método de detecção de *Brucella* spp. em amostras de produtos lácteos, considerando-se que não é necessária a viabilidade do agente, permitindo o diagnóstico em amostras deterioradas ou contaminadas por outros microrganismos.

A diferenciação da origem da cepa existente nos produtos lácteos revelou a ocorrência da cepa vacinal B19, vacina viva atenuada para fêmeas bovinas, mas que pode ser perigosa para machos e quaisquer outras espécies incluindo o homem, em 30/37 (81,08%) das amostras positivas, devendo ser motivo de alerta por se constituir risco à saúde pública se ocorrer o escape de brucelas viáveis no processamento destes produtos. Além da presença de anticorpos

vacinais em fêmeas adultas, a B19 pode infectar persistentemente o útero dependendo da idade e “status” reprodutivo da fêmea na vacinação, e da dosagem e método de vacinação utilizados, ocorrendo então a eliminação constante ou intermitente da vacina pelo leite. Em alguns casos em que os animais são vacinados na idade recomendada (3 a 8 meses), também pode ocorrer abortamento ou infecção persistente pela vacina, havendo sua eliminação pelo leite. Pela alta ocorrência da cepa vacinal encontrada (81,08%) sendo excretada pelo leite, conclui-se que a vacinação contra brucelose bovina não tem sido aplicada como recomendada pelo PNCEBT em alguns locais, ou seja, pode estar ocorrendo a vacinação de animais mais velhos bem como a revacinação, ou a dosagem pode não estar sendo respeitada, ou ainda, a transmissão do microrganismo pela não higienização das ordenhadeiras mecânicas, provocando sua disseminação pelo rebanho.

A brucelose animal é um grande problema mundial e é endêmica na maioria das áreas do mundo, com exceção de países como Austrália, Nova Zelândia e Canadá, que erradicaram a doença por medidas higiênicas veterinárias estritas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Mesmo em países onde todas as formas da doença foram erradicadas, a vigilância contínua é essencial para a prevenção da reintrodução da doença (BRICKER, 2002).

A qualidade deve ser percebida no produto e no seu processamento, sendo que o produtor de leite constrói a qualidade desde os cuidados com o manejo sanitário dos animais, seguindo corretamente o cronograma de vacinações, utilizando adequadamente os produtos veterinários, ordenhando as vacas com higiene, entre outros. Mas também, no momento de resfriar e transportar o produto desde a fazenda até a plataforma da usina. Na usina, por sua vez, é necessário prezar e controlar a qualidade do produto recebido e mantê-la em toda a linha de pasteurização, esterilização ou processamento para a elaboração de derivados. Dado o produto final, cuidados são necessários na forma de comercialização e

nas condições de acondicionamento, transporte e distribuição, bem como na manipulação correta do produto nos estabelecimentos de varejo. Os consumidores preocupam-se muito pouco ainda com a origem da matéria prima dos queijos que consome, valorizando no caso do leite fluido o fato de vir direto da fazenda, sem passar por processos de pasteurização, agravando o risco de transmissão de doenças. É importante ressaltar que, neste estudo, a classificação da origem das amostras é quanto ao seu ponto de venda, e não à fonte leiteira, o que infere apenas na grande difusão de produtos sem fiscalização no mercado do Estado de São Paulo e em alguns pontos do Estado de Minas Gerais. Foram apreendidas 67 amostras no Estado de Minas Gerais, sendo 49 queijos frescais e 18 queijos meia-cura, e 233 amostras no Estado de São Paulo, sendo 108 leites crus, 92 queijos frescais e 33 queijos meia-cura. Em Minas Gerais, 22,45 % (11/49) das amostras de queijo frescal foram positivas para *Brucella abortus* enquanto que em São Paulo foram 19,57 % (18/92). Dos queijos meia-cura analisados, em Minas Gerais 11,11% (2/18) das amostras foram positivas para *Brucella abortus* e em São Paulo foram 18,18 % (6/33).

O presente trabalho mostrou-se eficiente na padronização de técnicas moleculares sensíveis e específicas a serem aplicadas em amostras lácteas para detecção de *Brucella* spp., bem como na diferenciação da espécie *Brucella abortus* em cepa vacinal B19 ou de campo, auxiliando o PNCEBT no controle da brucelose bovina. Os resultados alertam para o fato de que a vacinação incorreta e/ou a prática de manejos inadequados, como as que ocorrem no mercado clandestino de leite e derivados, merecem uma especial atenção das autoridades para que o programa PNCEBT seja efetivo no cumprimento dos seus objetivos.

6 CONCLUSÕES

- Não foi possível isolar *Brucella* spp. a partir dos leites e subprodutos lácteos clandestinos pesquisados.
- Pela PCR foi possível detectar a presença de *Brucella* spp. em 37/192 (19,27%) amostras de queijo analisadas.
- Foi possível realizar a reação de PCR para diferenciação da espécie *Brucella abortus* para estas amostras clínicas, e a reação revelou que 100% das amostras positivas para *Brucella* spp. são da espécie *Brucella abortus*.
- Foi possível a padronização da reação para diferenciação entre cepa vacinal (B19) e campo, tendo sido instituída a reação de hemi-nested PCR para melhorar a sensibilidade analítica da prova, para que todas as amostras positivas para *Brucella* spp. fossem diferenciadas. Esta etapa revelou a presença da B19 em 30/37 amostras positivas (81,08%), e cepa de campo em 7/37 amostras (18,92%).
- O índice de concordância entre as técnicas de isolamento para *Brucella* spp. e da PCR foi considerado baixo ($K = 0$).

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Brucellosis. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: OPAS, 1986. p 6-24.
- ADAMS, L. G. Development of live *Brucella* vaccines. In: _____. **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press, 1990. p. 250-276.
- ALTON, G. G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 12, p. 551-557, 1978.
- ALTON, G. G.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 8, p. 269-272, 1980.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1988. p. 109.
- ARELLANO-REYNOSO, B.; DÍAZ-APARICIO, E.; LEAL-HERNÁNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, L.; GORVEL, J. P. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3-4, p. 307-312, 2004.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. W.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.
- 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, 1994. v.2, p. 1053-1066.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 4 maio 2004.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, Nov. 1994.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1640-1642, Jun 1995.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-446, 2002.

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

CASTELL, M. J.; RULLAN, J. V.; PEIRO CALLIZO, E. F.; NIETO-SANDOVAL, A. A. Epidemic outbreak of 81 cases of brucellosis following the consumption of fresh cheese without pasteurization. **Revista Española de Salud Publica**, v. 70, n. 3, p. 303-311, May-Jun. 1996.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

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

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 foetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, n. 252, p. 1643-1651, 1991.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FARINA, E. M. M. Q.; JANK, M. S.; NASSAR, A. M.; RIBEIRO, F. A. F. Leite clandestino: um problema real! **Boletim do Leite**, v. 7, n. 81, 2000. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em 18 de agosto de 2003.

FEKETE, A.; BANTLET, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, v. 4, n. 1, p. 79-83, 1992.

GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; STAAL, C.; PROTZ, D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, v. 142, n. 19, p. 512-514, 1998.

GARCIA-CARRILLO, C. Situação atual e perspectivas do emprego de imunógenos no controle da brucelose. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 8, p. 201-203, 1984.

GARCIA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the Ameñcas**. Paris: Office International des Epizooties, 1990. 299 p.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GEONG, M.; ROBERTSON, I. D. Response of Bali cattle (*Bos javanicus*) to vaccination with *Brucella abortus* strain 19 in West Timor. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 47, p. 177-186, 2000.

HAMDY, M. E. R.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **The Veterinary Journal**, n. 163, p. 299-305, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 789 p.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I. O.; LÓPEZ-MÉRINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, I. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, Dec. 1995.

LEYLA, G.; KADRI, G.; ÜMRAN, O. K. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 53-61, 2003.

MATAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDELNIOOR, A. M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 477-478, Feb. 1996.

MERT, A.; OZARAS, R.; TABAK, F.; BILIR, M.; YILMAZ, M.; KURT, C.; ONGOREN, S.; TANRIVERDI, M.; OZTURK, R. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, n. 4, p. 241-243, 2003.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Ed). **Handbook series in zoonoses**: section A, bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.

MEYER, M.E. Characterization of *Brucella abortus* strain 19 isolated from human and bovine tissues and fluids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 4, p. 902-904, 1985.

MILLER, M. A.; PAIGE, J. C. Other food borne infections. **Veterinary Clinics of North American. Food Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 71-89, Mar. 1998.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 283-299.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 27, p. 9-17, 1995. Número extraordinário.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453 p.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **Brucelosis bovina, ovina y caprina**. Série Técnica n. 6, 1987, 282 p.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/OMS de expertos em brucelosis**. Ginebra, 1986. 149 p. (Série de informes técnicos, 740).

PAHO/WHO - Pan American Health Organization / World Health Organization. **Brucellosis PAHO/WHO Experts Consultation Meeting on Vaccines and Vaccination Strategies**, 1999.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina. Situação brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003. 154 p.

PEARCE, J. H.; WILLIAMS, A. E.; HARRIS-SMITH, P. W.; FITZGEORGE, R. B.; SMITH, H. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids which stimulates the growth of *B. abortus* in bovine phagocytes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 31-37, 1961.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 55-62, 2002.

QUEIPO-ORTUÑO, M. O.; MORATA, P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; DIOGOS COMEVARO, J. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2927-2930, Nov. 1997.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1996. 648 p.

ROMERO, L.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 615-617, 1995a.

ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, M. J.; DIAZ, R.; BLASCO, J. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, Dec. 1995 b.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, Aug. 1999.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 95-101, 1993.

SANGARI, F. J.; GARCÍA-LOBO, J. M.; AGÜERO, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p. 337-342, 1994.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. Improvement of the *Brucella abortus* B19 vaccine by its preparation in a glycerol based medium. **Vaccine**, v. 14, n. 4, p. 274-276, 1996.

SANGARI, F. J.; GRILLÓ, M. J.; BAGUÉS, M. P. I.; GONZÁLEZ-CARRERÓ, M. I.; GARCIA-LOBO, J. M.; BLASCO, J. M.; AGÜERO, J. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strains is unrelated with its attenuated virulence in mice. **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1640-1645, 1998.

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

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**, v. 2, n. 66, p. 313-317, 1999.

SUTHERLAND, S. S.; ROBERTSON, A. G.; LE CRAS, D. V.; ROBERTSON, G. M.; JOHNSTON, J. M., EVANS, R. J. The effect of challenge with virulent *Brucella abortus* on beef cattle vaccinated as calves or adults with either *Brucella abortus* strain 19 or 45/20. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 470-473, Oct. 1981.

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 479-496, 2002.

TANTILLO, G.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 164-167, 2001.

THOPAR, M. K.; YOUNG, E. J. Urban outbreak of goat cheese brucellosis. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 640-643, Nov.Dez. 1986.

THRUSFIELD, M. Diagnostic testing. In: _____. **Veterinary epidemiology**. Great Britain: The University Press, 1995. p. 266-285

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates, 1988. p.135-152.

TIZARD, I. R. Vacinação e vacinas. In: _____. **Imunologia veterinária - uma introdução**. São Paulo: Roca, 1996. p. 273-293.

VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1089-1100, 2000.