Marianna Matrone

Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com a cepa 2308

São Paulo

2008

MARIANNA MATRONE

Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental 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. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1978
FMVZ

Matrone, Marianna

Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308 / Marianna Matrone. – São Paulo : M. Matrone, 2008.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Bovinos. 2. Brucelose animal. 3. Reação em Cadeia pela Polimerase. 4. Bezerros. 5. *Brucella abortus*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308", protocolado sob o nº1133/2007, utilizando amostras de fetos abortados e bezerros previamente sacrificados, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, 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 em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "Evaluation of different protocols of DNA extraction for *Brucella abortus* detection from aborted fetus materials or from calves born from experimentally infected cows with 2308 strain", protocol number 1133/2007, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de vacina contra brucelose bovina não indutora de anticorpos (VNIA)" Protocolo nº 296/2003, utilizando 120 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, 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 referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of a new vaccine against bovine brucellosis" protocol number 296/2003, utilizing 120 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 03 de abril de 2003

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MATRONE, Marianna

Título: Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308

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: _____

DEDICATÓRIAS

Em primeiro lugar aos meus pais Julio e Marilurdes, pelo amor, confiança e ensinamentos em todos os dias de minha vida. A eles devo tudo o que sou e também o que um dia serei. Obrigado por existirem e por me mostrarem o caminho de Deus e da honestidade dos homens.

Aos meus irmãos Mauricio e Marcella, por todo amor, união, carinho e apoio, sempre presentes desde o início da minha existência. Amo vocês.

Aos meus cunhados Rui e Patrícia, pela amizade e carinho, sempre me apoiando e ajudando na realização de muitas conquistas.

Às minhas avós Julia e Lourdes pelo amor e ensinamentos durante toda minha vida

Aos animais, por serem essenciais à vida humana, em especial, meus amados companheiros Francesca, Luigi, Filippo Tedesco e Minnie, por fazerem parte da minha história de vida e por estarem presentes em muitos pedaços deste trabalho, sempre transmitindo paz, cumplicidade e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque acima de tudo é a pessoa mais importante da minha vida, estando presente em todos os dias da minha caminhada, me transmitindo luz, fé, sabedoria e força para enfrentar os obstáculos que surgem no decorrer da nossa existência.

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, pela amizade, confiança e oportunidade em realizar esta dissertação.

As Profas. Simone e Evelise pela amizade e força durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Rodrigo Martins Soares e Paulo Eduardo Brandão, por me ajudarem na realização do projeto, sempre com disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Fernando Ferreira pela paciência e ajuda em toda parte estatística da minha dissertação.

Ao César Alejandro Rosales Rodrigues, pela amizade e apoio, e por transmitir seus conhecimentos moleculares durante a realização do trabalho.

A amiga Lara Borges Keid, pelo companheirismo, amizade e ensinamentos, que foram peças fundamentais para a realização total do projeto.

Aos amigos pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Flávia, Amane, Vivianne, Flávia Carolina, Cássia, Carlos, Ricardo, Wilsilene, sobretudo pela amizade, convivência, força, apoio e ajuda durante todo o período do mestrado, à vocês meu muito obrigado.

À querida amiga Pilar, meu agradecimento especial pela amizade tão sincera, diversão, horas agradáveis de convivência durante os dias no laboratório e ajuda em grande parte da realização do meu projeto experimental.

À Gisele Oliveira de Souza e Zenaide Maria de Moraes pela sempre disponibilidade, amizade e ensinamentos durante a realização do deste trabalho.

Aos amigos Sandra e Bispo pela força e apoio durante todo o período de pós.

Aos professores e funcionários do VPS, pela oportunidade, força e ensinamentos necessários na minha formação profissional.

A todos os pós-graduandos do VPS, em especial Alessandra, Vanessa, Sibeles, Aldo, Anaiá, Iara, Mauricio, Estela, Karen, Pati Pink e Dani Ribeiro pela amizade e por muitos momentos de convivência, estudo e ajuda.

Ao LABMAS por permitir o aprendizado de muitos conhecimentos moleculares, assim como por também ter sido importante na realização da parte experimental.

A Sheila Oliveira de Souza, pela amizade e força, sempre com muita disponibilidade em ajudar.

Ao Laboratório de Sanidade Suína Profa. Andréa Moreno e os pós: Renata, Sérgio, Tânia e Débora, pela amizade e grande ajuda na realização da parte experimental.

Aos secretários Virgínia, Cristina, Tânia, Danival pelo coleguismo e ajuda.

Às secretárias da pós-graduação da FMVZ-USP, Dayse, Claudia e Joana, por toda ajuda durante o período da pós.

A equipe da biblioteca da FMVZ-USP, pela atenção e profissionalismo, em especial Elza.

As minhas amigas Karina, Marcela, Carolina Mosca, Milena, Simone e Suelen, por muitos anos de amizade verdadeira, por me apoiarem em vários momentos da minha caminhada e por sempre transmitirem alegria e compreensão.

As sempre amigas Patrícia Borelli Noronha e Sabrina Caruso Chate, que são pessoas fundamentais em minha vida, pela amizade sincera e verdadeira, sempre me apoiando e incentivando mesmo perante as dificuldades.

Às amigas Salesianas, por tantos anos de amizade e companheirismo, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos humanitários ajudando em minha formação pessoal, sempre proporcionando muitas alegrias e exemplos de vida. A vocês, agradeço pelo muito que sou.

Arriva fino a dove puoi vedere. Quando sei lì potrai vedere più lontano (Thomas Carlyle)

**Quem admira uma casa de linda construção, não irá dizer que foi o acaso que a construiu e organizou. Quem dissesse que um relógio se fez por si mesmo, seria desprezado como um louco. Assim, vendo a ordem e a magnífica harmonia que reina no universo, não se pode hesitar um só instante em crer em um Deus que criou, deu movimento a todas as coisas e as conserva.
(San Giovanni Bosco – D. Bosco)**

Ser veterinário não é só cuidar dos animais...

É sobretudo amá-los, não ficando somente nos padrões éticos de uma ciência médica. Ser veterinário é acreditar na imortalidade da natureza e querer preservá-la sempre mais bela. É ouvir miados, mugidos, balidos, relinchos e latidos, e principalmente entendê-los. É gostar de terra molhada, de mato fechado, de luas e chuvas. Ser veterinário é não se importar se os animais pensam, mas sim se sofrem. É dedicar parte do seu ser à arte de salvar vidas. Ser veterinário é aproximar-se de instintos. É perder medos. É ganhar amigos de pêlos e penas, que jamais irão decepcioná-lo. Ser veterinário e não gostar de gaiolas, jaulas e correntes. É perder um tempo acompanhando rebanhos e vôos de gaivotas. É permanecer descobrindo, por intermédio dos animais, a si mesmo. Ser veterinário é ser o único capaz de entender rabos abanando, arranhões carinhosos e mordidas de afeto. É sentir cheiro de pêlo molhado, cheiro de almofada com essência de gato, cheiro de baias, de curral e de esterco. Ser veterinário é ter capacidade de compreender gratidões mudas, mas sem dúvida alguma, as únicas verdadeiras. É adivinhar olhares, é lembrar do seu tempo de criança, é querer levar para casa todos os animais sem dono. Ser veterinário é conviver lado a lado com ensinamentos profundos sobre o amor à vida.

(Autor desconhecido)

RESUMO

MATRONE, M. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308.** [Evaluation of different protocols of DNA extraction for *Brucella abortus* detection from aborted fetus materials or from calves born from experimentally infected cows with 2308 strain]. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A *Brucella abortus* causa diminuição da eficiência reprodutiva em bovinos e é também o agente de uma das zoonoses mais difundidas no mundo. A doença é alvo de programas de controle em muitos países e, no Brasil, seu combate foi melhor organizado a partir de 2001, com o lançamento de programa nacional pelo MAPA. O objetivo do presente estudo foi aperfeiçoar a detecção de *B. abortus* em homogeneizados de órgãos de fetos abortados por vacas infectadas. Assim, foram comparados diferentes protocolos de extração de DNA, visando à detecção de *B. abortus* pela PCR em amostras clínicas colhidas de fetos abortados ou bezerros oriundos de vacas experimentalmente desafiadas com *B. abortus* cepa 2308. Para tanto, foram construídos dois grupos padrão ouro com base na bacteriologia clássica, constituídos por: 32 pulmões (17 positivos ao isolamento), 26 baços (11 positivos ao isolamento), 23 fígados (8 positivos ao isolamento) e 22 linfonodos bronquiais (7 positivos ao isolamento). Todas essas amostras foram submetidas a três distintos protocolos de extração de DNA, seguidos do mesmo processo de amplificação com os primers B4 e B5. A análise dos resultados consolidados mostrou uma sensibilidade de 95% para o protocolo da proteinase K (PK), 86% para o do isotiocianato de guanidina (GT) e de 88% para o de Boom. Os valores encontrados de Sensibilidade para pulmão, baço, fígado e linfonodo foram, respectivamente, 100%, 100%, 100% e 71% (PK), 82%, 100%, 88% e 71% (GT) e 94%, 100%, 63% e 86% (Boom). No grupo dos animais dos quais não foi possível isolar brucellas (gold standard negativo), a PCR resultou positiva em 8 amostras para o protocolo de extração PK (4 pulmões, 1 fígado e 3 linfonodos), em 6 amostras para o protocolo de extração GT (1 pulmão, 3 fígados e 2 linfonodos) e em 37 amostras para o protocolo de extração Boom (10 pulmões, 10 baços, 10 fígados e 7 linfonodos). Esses resultados permitem afirmar que o protocolo de extração PK apresentou a melhor sensibilidade diagnóstica e que o protocolo de extração de Boom apresentou o melhor desempenho nas amostras onde o isolamento foi negativo. Dentre os órgãos estudados, o baço apresentou a maior probabilidade de detecção de *B. abortus*. Assim, a melhor estratégia para detecção de *B. abortus* em homogeneizados de órgãos de fetos abortados é a utilização do isolamento e da PCR em paralelo.

Palavras-chave: Brucelose. Bovinos. Reação em Cadeia pela Polimerase. *Brucella abortus*.

ABSTRACT

MATRONE,M.; **Evaluation of different protocols of DNA extraction for *Brucella abortus* detection from aborted fetus materials or from calves born from experimentally infected cows with 2308 strain** [Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de materiais colhidos de feto abortado ou bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com cepa 2308] 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Infection by *Brucella abortus* diminishes the reproductive efficiency in bovines and it is also the agent of one of the most spread zoonosis in the world. In many countries control programs aim this disease, and in Brazil its combat was better organized since 2001 with the creation of the national program by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supplies (MAPA). The objective of the present study was to improve the detection of *B. abortus* in aborted fetus homogenates from infected cows. For that reason, different DNA extraction protocols were compared, focusing the PCR detection of *B. abortus* in clinical samples collected from aborted fetus or calves obtained from cows experimentally defied with the 2308 *B. abortus* strain. Therefore, two gold standard groups were built based on classical bacteriology, formed by: 32 lungs (17 isolation positives samples), 26 spleens (11 isolation positives samples), 23 livers (8 isolation positives samples) and 22 bronchial lymph nodes (7 isolation positives samples). All samples were submitted to three distinct DNA extraction protocols, followed by the same amplification process with the primers B4 and B5. The analysis of the consolidated results showed a 95% sensibility for the proteinase K protocol (PK), 86 % for the guanidine isotiocianate (GT) and 88% for the Boom. The sensibility values obtained for lungs, spleen, liver and lymph node were, respectively, 100%, 100%, 100% and 71% (PK), 82%, 100%, 88% and 71% (GT) and 94%, 100%, 63% and 86% (Boom). In the group of animals in which it was not possible to isolate brucellas (negative gold standard), the PCR resulted positively in 8 samples for the PK extraction protocol (4 lungs, 1 liver and 3 lymph nodes), in 6 samples for the GT extraction protocol (1 lung, 3 livers and 2 lymph nodes) and in 37 samples for the Boom extraction protocol (10 lungs, 10 spleens, 10 livers and 7 lymph nodes). These results permit affirming that the PK extraction protocol showed the best diagnostic sensibility and that the Boom extraction protocol showed the best performance in negative isolation samples. Within the studied organs, the spleen showed the highest probability of *B. abortus* detection. Therefore, the best strategy for *B. abortus* detection in organs homogenates from aborted fetus is the utilization of isolation and in parallel, the PCR.

Keywords: Bovine. Brucellosis. Polymerase Chain Reaction. *Brucella abortus*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 –** Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração enzimática do DNA por Proteinase K - São Paulo – 2008 80
- FIGURA 2 -** Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração do DNA pelo Isotiocianato de Guanidina (GT) - São Paulo – 2008 81
- FIGURA 3 -** Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração do DNA pelo Boom - São Paulo – 2008 82

LISTA DE GRÁFICOS

GRAFICO 1 –	Correlação entre a concentração de <i>Brucella abortus</i> /mL e a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) extraída pelo protocolo PK - São Paulo – 2008	48
GRAFICO 2 –	Correlação entre a concentração de <i>Brucella abortus</i> /mL e a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) extraída pelo protocolo GT- São Paulo – 2008	48
GRAFICO 3 –	Correlação entre a concentração de <i>Brucella abortus</i> /mL e a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) extraída pelo protocolo do Boom - São Paulo – 2008	49
GRAFICO 4 –	Correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) verificadas por três protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> - São Paulo- 2008	50
GRAFICO 5 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para o protocolo de extração PK e diferentes concentrações de <i>Brucella abortus</i> /mL - São Paulo – 2008	52
GRAFICO 6 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para o protocolo de extração GT e diferentes concentrações de <i>Brucella abortus</i> /mL - São Paulo – 2008	52
GRAFICO 7 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para o protocolo de extração do Boom e diferentes concentrações de <i>Brucella abortus</i> /mL - São Paulo – 2008	53
GRAFICO 8 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM verificadas por três protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> - São Paulo- 2008	54
GRAFICO 9 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em pulmão de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	57
GRAFICO 10 –	Correlação entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de amostras de pulmão de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	59

GRAFICO 11 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em baço de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	62
GRAFICO 12 –	Correlação entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> (µg/mL) obtidas por três protocolos de extração de amostras de baço de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	64
GRAFICO 13 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em fígado de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	67
GRAFICO 14 –	Correlação entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> (µg/mL) obtidas por três protocolos de extração de amostras de fígado de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	69
GRAFICO 15 –	Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em linfonodo bronquial de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008.....	72
GRAFICO 16 –	Correlação entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> (µg/mL) obtidas por três protocolos de extração de amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008 ...	74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico de brucelose, através do gene codificador de 31 kDa da proteína de membrana da <i>Brucell</i> - São Paulo,2008.....	43
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Resultados do isolamento e da detecção de <i>Brucella abortus</i> 2308 pela PCR para três protocolos de extração de DNA, segundo diferentes concentrações bacterianas - São Paulo – 2008 46
TABELA 2 -	Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de <i>Brucella abortus</i> 2308 obtidas por três protocolos de extração de DNA, segundo diferentes concentrações bacterianas - São Paulo – 2008 47
TABELA 3 –	Coeficiente de correlação de Pearson referente à comparação das concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> - São Paulo- 2008 50
TABELA 4 -	Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo diferentes concentrações de <i>Brucella abortus</i> - São Paulo – 2008... 51
TABELA 5 –	Coeficiente de correlação de Pearson resultante da comparação das razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM entre os três protocolo de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> - São Paulo – 2008 54
TABELA 6 –	Resultados da detecção de <i>Brucella abortus</i> pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008 55
TABELA 7 -	Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de pulmão de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008 56
TABELA 8 –	Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em pulmão de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008 57
TABELA 9 -	Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de pulmão de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008 58
TABELA 10 –	Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de pulmão de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008 59

TABELA 11 —	Resultados da detecção de <i>Brucella abortus</i> pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de baço de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	60
TABELA 12 -	Razão entre as leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de baço de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008 ..	61
TABELA 13 -	Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em baço de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	62
TABELA 14 -	Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de baço de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	63
TABELA 15 –	Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de baço de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	64
TABELA 16 –	Resultados da detecção de <i>Brucella abortus</i> pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	65
TABELA 17 -	Razão entre as leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de fígado de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008 ..	66
TABELA 18 -	Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em fígado de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	67
TABELA 19 -	Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de fígado de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	68
TABELA 20 –	Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de fígado de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	69
TABELA 21 –	Resultados da detecção de <i>Brucella abortus</i> pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	70

TABELA 22 -	Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de linfonodo bronquial de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008	71
TABELA 23 -	Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três diferentes protocolos de extração de DNA de <i>Brucella abortus</i> em linfonodo bronquial de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008	72
TABELA 24 -	Concentrações de DNA (µg/mL) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de linfonodo bronquial de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008	73
TABELA 25 -	Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de <i>Brucella abortus</i> (µg/mL) obtidas por os três protocolos de extração em de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008	74
TABELA 26 –	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008.....	75
TABELA 27 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de baço de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008.....	75
TABELA 28 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008.....	76
TABELA 29 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008	76
TABELA 30 –	Resultados consolidados por órgãos de feto abortado de bovino para detecção de <i>Brucella abortus</i> pela PCR realizada com três protocolos de extração de DNA, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008	77
TABELA 31 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008.....	77

TABELA 32 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de baço de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008.....	78
TABELA 33 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008.....	78
TABELA 34 -	Resultados da PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008	79
TABELA 35 -	Resultados consolidados por órgãos de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 para detecção de <i>Brucella abortus</i> pela PCR realizada com três protocolos de extração de DNA - São Paulo – 2008	79

LISTA DE ABREVIATURAS

dATP	desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	desoxi-citosina trifosfato
dGTP	desoxi-guanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dTTP	desoxi-timidina trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino tetracético
GT	Tiocianato de Guanidina
HCl	ácido clorídrico
KDa	kilodalton
L	litro
μL	microlitro
μg/mL	micrograma por mililitro
mg	miligrama
mL	mililitro
M	molar (mol por litro)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
bp	base pair (pares de base)
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
pK	proteínase K
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
Tris HCl	Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
X	vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
>	maior
<	menor
=	igual
+	mais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 CARACTERÍSTICA DO AGENTE	28
2.2 PATOGENIA.....	29
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	30
2.4.DIAGNÓSTICO	31
2.4.1 Métodos indiretos	31
2.4.2 Métodos diretos	32
2.5 CONTROLE.....	35
3 OBJETIVO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 PADRÃO OURO.....	38
4.2 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS.....	38
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	39
4.3.1 Protocolo 1 – Lise enzimática por Proteinase K e fenol:clorofórmio– PK	39
4.3.2 Protocolo 2 – Isotiocianato de Guanidina – GT	40
4.3.3 Protocolo 3 – Boom	41
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	42
4.5 AMPLIFICAÇÃO E <i>PRIMERS</i>	43

4.5.1 Para o protocolo da proteinase k.....	43
4.5.2 Para o protocolo do GT	43
4.5.3 Para o protocolo do Boom.....	44
4.5.4 Para as amplificações foi adotado o seguinte ciclo	44
4.6 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	44
4.7 CONTROLES	45
4.8 TRATAMENTO DOS DADOS	45
5 RESULTADOS	46
5.1 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS.....	46
5.2 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO DNA	54
5.2.1 Admitindo como <i>gold standard</i> o isolamento.....	54
5.2.2 Admitindo como <i>gold standard</i> a infecção experimental	77
6 DISCUSSÃO	83
6.1 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS.....	83
6.2. ADMITINDO COMO <i>GOLD STANDARD</i> O ISOLAMENTO	84
6.3 ADMITINDO COMO <i>GOLD STANDARD</i> A INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	86
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A *Brucella* spp é uma bactéria Gram-negativa, intracelular facultativa que infecta animais domésticos e silvestres e também humanos. Nos animais a doença está relacionada a problemas reprodutivos e no homem geralmente produz quadros de infecção generalizada (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Este gênero de bactérias se replica em fagócitos mononucleares do hospedeiro, inibindo os mecanismos extracelulares da resposta imune (SALDARRIAGA et al., 2002).

A brucelose bovina, causada pela *Brucella abortus*, é uma das zoonoses mais difundidas no mundo e alvo de programas de controle e erradicação em muitos países. O Brasil organizou melhor o combate à doença a partir de 2001, com o lançamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (www.agricultura.gov.br).

Os programas de combate à brucelose apóiam-se na utilização de métodos diretos e indiretos de diagnóstico. Os indiretos são utilizados nas rotinas de certificação de propriedades livres e monitoradas (LAGE, 2006). Os métodos diretos são empregados para a comprovação bacteriológica de focos, no âmbito de sistemas de vigilância, implementados na fase de erradicação da doença. Classicamente, o diagnóstico direto é feito através de isolamentos em meios de cultura com posterior identificação dos isolados através de métodos bacteriológicos clássicos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). As desvantagens desse método são o alto custo, o tempo necessário para crescimento e identificação das bactérias isoladas, além do alto risco para o operador (FEKETE, 1992).

Uma alternativa aos métodos bacteriológicos clássicos é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), no qual se detecta um fragmento específico do DNA bacteriano presente nas amostras analisadas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados com amostras de campo para avaliar esta ferramenta diagnóstica (GULER et al., 2003).

Embora a PCR seja um método diagnóstico muito vantajoso pela sua rapidez e alta sensibilidade e especificidade (BRICKER, 2002; DAHOUK, 2003), possui também desvantagens que são alto custo, principalmente de equipamentos, e os fatores inibidores da amplificação do ácido nucléico, como proteínas séricas, debris celulares somáticos, polissacárides e outros componentes dos fluidos corpóreos (WILSON, 1997). Esses fatores inibidores são os principais responsáveis pelos resultados falsos negativos. A Comparação do genoma total das espécies de *Brucella* spp é importante para identificar

os fatores responsáveis pela diferença de hospedeiros e a virulência (RAJASHEKARA et al., 2004).

Uma das formas de se detectar focos de brucelose no âmbito de um sistema de vigilância é a análise bacteriológica de fetos abortados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Os materiais de eleição para a tentativa de isolamento de *Brucella* spp em fetos bovinos são líquido abomasal, suab retal, linfonodo bronquial, pulmão, fígado e baço (POESTER et al., 2006). Esses materiais, notadamente os fragmentos de órgãos, estão sujeitos à ação de inibidores da amplificação do ácido nucléico (WILSON, 1997). A solução para esse problema, diminuindo o número de falsos negativos à reação, pode ser o protocolo de extração do DNA.

Assim, tendo em vista a importância da análise bacteriológica do feto abortado para um sistema de vigilância de brucelose bovina e a ocorrência de falsos negativos à PCR quando a amostra clínica é representada por homogeneizado de órgãos, o presente projeto pretende comparar vários protocolos de extração de DNA em homogeneizados de órgãos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

Brucella é uma bactéria intracelular facultativa, Gram-negativa que pode infectar muitas espécies animais e o homem. São cocobacilos curtos, pequenos e pleomórficos, não formam cápsulas ou esporos e nem se movimentam ativamente (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; RIEMANN; CLIVER, 2006; CHU; WEYANT, 2003).

O gênero *Brucella* compreende 6 espécies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* (grupo das lisas ou clássicas), *B. ovis*, *B. canis* (grupo das rugosas). No grupo das lisas ou clássicas algumas espécies são subdivididas em vários biovars ou biótipos (*B. melitensis*: 3; *B. abortus*: 7; *B. suis*: 4) que se identificam principalmente por testes bioquímicos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; CIPOLLA et al., 2004; LAGE, 2006; ALTON et al., 1975). Recentemente, foram isoladas de mamíferos marinhos, duas novas espécies de *Brucella*, descritas através da diferenciação fenotípica e de características moleculares baseadas no polimorfismo do DNA no locus *omp2* e preferência por hospedeiros, a *B. cetaceae* e *B. pinnipediae* (CLOECKAERT et al., 2003).

As variantes lisas ou rugosas são reconhecidas através da morfologia da colônia e para algumas espécies quanto à virulência. A morfologia está relacionada com a composição do lipopolissacarídeo na membrana celular. As lisas possuem lipídeo A, núcleo oligossacáride e cadeia O, já as rugosas possuem apenas lipídeo A e parte do núcleo oligossacáride (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE, 2006). Para algumas espécies de *Brucella spp*, o microorganismo virulento típico forma uma colônia lisa e transparente e tende sofrer mutação para forma rugosa, que é menos virulenta.

A maior proteína externa de membrana de *Brucella spp* foi identificada no início de 1980 e classificada de acordo com sua massa molecular em proteínas do grupo 2 (36-38 Kilodalton - kDa) e proteínas de grupo 3 (25-27 kDa e 31-34 kDa). Os genes *omp 25* e *omp 31* codificam para o grupo 3. A maior parte dos genes que codificam proteínas de membrana externa exibem diversidade entre espécies de *Brucella spp*, biovars e cepas, permitindo sua diferenciação e identificação de marcadores polimórficos que são utilizados em estudos filogenéticos e das variações antigênicas do gênero *Brucella* (CLOECKAERT et al., 1996).

A constituição da parede celular das brucelas confere a elas uma resistência importante ao meio ambiente. A associação de presença de umidade, sombreamento e

baixas temperaturas aumentam a sobrevivência do agente no meio ambiente, ampliando sua chance de alcançar um novo suscetível. A luz solar direta diminui sua sobrevivência (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Os métodos de pasteurização ou a fervura inativam a bactéria, que também é sensível a vários grupos de desinfetantes químicos (LAGE, 2006).

2.2 PATOGENIA

As principais portas de entrada da *B. abortus* são as mucosas oral, nasal, genital e ocular. Após a penetração na mucosa, as bactérias são fagocitadas, multiplicam-se nos linfonodos regionais e a partir daí poderão disseminar-se pela via hemática e linfática, albergando-se nos tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver por longos períodos dentro dos fagócitos, escapando assim da resposta imune (LAGE, 2006).

Uma vez que a *Brucella spp* é capaz de replicar-se intracelularmente, a resposta imune mediada por células é a mais importante nos fenômenos da relação hospedeiro-parasita. A patogenia da infecção por *Brucella spp* é muito complexa, dependendo da espécie do microrganismo e do hospedeiro envolvidas. Dentre os elementos da imunidade celular têm destaque os macrófagos, as citocinas tipo Th 1 e as células citotóxicas (SALDARRIAGA et al., 2002).

Importante lembrar, que esta bactéria move-se através dos vasos linfáticos e se desloca pelos órgãos através da corrente sanguínea, instalando-se preferencialmente em baço, linfonodos, fígado, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero. A *Brucella* tende a se multiplicar no útero de animais suscetíveis, onde seu crescimento é favorecido pela presença da substância eritritol, produzido no feto e nas membranas circundantes. As lesões necrótico-inflamatórias placentárias impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando assim, o aborto (TORTORA, 2000; LAGE, 2006). Em geral o aborto se dá na segunda metade da prenhez, causando retenção placentária ou metrites que podem ser causa de infertilidade permanente (ACHA; SZYFRES, 2001). O eritritol é um álcool poli-hídrico de quatro carbonos produzidos a partir dos líquidos alantoideano e amniótico bovino (PEARCE et al., 1961). Este álcool, não está presente na placenta humana (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

A resistência de bovinos à infecção por *Brucella* pode ser influenciada pela idade, sexo e potencial reprodutivo de cada animal. Fêmeas em gestação são mais suscetíveis à infecção do que as jovens. Estas podem infectar-se por contato com fetos abortados ou

placentas contaminadas com a bactéria (THOEN; ENRIGHT, 1988). Em touros, ocasionalmente a infecção localiza-se nos testículos, epidídimo ou vesícula seminal formando abscessos (IKRAM; HILL, 1991).

Nos bovinos infectados, a eliminação do agente se dá por descargas uterinas, sêmen e fezes. Quando o animal não está prenhe, excreta bactéria no leite (TORTORA, 2000), que se inicia após duas semanas do parto ou abortamento, podendo persistir por meses. Com a expulsão do feto, no parto ou abortamento, uma grande quantidade de bactérias é eliminada para o meio ambiente, contaminando pastagens, água e alimentos. O risco da transmissão venérea pela monta natural é muito baixo, porém alto pela inseminação artificial (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). As principais formas de transmissão para humanos é através do consumo de alimentos lácteos contaminados, contato direto/indireto com animais infectados e exposição acidental em laboratório que trabalha com o agente (MARIANELLI et al., 2007).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A *Brucella abortus* reconhecida primeiramente por Bang em 1897 (CARTER; CHENGAPPA, 1991), tem distribuição mundial, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento da África, América do Sul, Oriente Médio e Ásia (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A Brucelose é uma zoonose re-emergente no mundo, causadora de grandes perdas econômicas diretas, relacionadas com a diminuição da performance reprodutiva nos animais de produção. Estimativas apontam a brucelose como a responsável pela diminuição na produção de leite e de carne e na produção de bezerros (LAGE, 2006).

A brucelose bovina no Brasil é conhecida desde 1922 e a bactéria causadora foi isolada de fetos abortados de bovinos no Estado de São Paulo em 1930 (MELLO, 1950). Garcia-Carrillo¹ (1987) apud Poester et al. em 2002 verificou a predominância dos biovars 1, 2 e 3 de *B. abortus* nos bovinos brasileiros, esta informação foi confirmada por Megid et al. em 2005, em um estudo realizado para caracterização dos biovars de *Brucella abortus* em bovinos abortados e fetos de búfalos d'água evidenciando também a infecção por *B. abortus* em búfalos d'água no país.

¹ GARCÍA-CARRILLO, C. La brucellosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Office International des Épizooties, Paris: 1987. 43-70 p.

Dentre as perdas indiretas, vale lembrar que é a mais freqüente infecção bacteriana adquirida em laboratório, causando doenças em humanos com sinais inespecíficos, afetando vários órgãos. O contato com animais infectados, a ingestão de produtos lácteos contaminados e a exposição acidental em laboratório que trabalha com bacteriologia de *Brucella* são as formas de infecção humana mais importantes (DAHOUK et al., 2003).

A alta incidência da brucelose humana é encontrada em regiões onde existem costumes de consumir leites de cabra e bovino crus ou queijos macios preparados com leite não pasteurizado (BRICKER et al., 2003). Importante ressaltar que esta doença em humanos é rara em países que adotaram programas de erradicação (principalmente vacinação), contra brucelose bovina, ovina e caprina, entretanto, continua endêmica, na Bacia Mediterrânea, Centro Leste, Oeste da África e América do Sul (MAURIN, 2005).

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Métodos indiretos

Embora sejam predominantemente direcionados para a pesquisa de anticorpos contra *Brucella* spp no soro, podem ser detectados em vários fluidos corporais. Existe intensa atividade científica visando o desenvolvimento e aperfeiçoamento de testes indiretos para brucelose bovina e os melhores deles estão referenciados e detalhados no Manual de Procedimentos para Testes Diagnósticos e Vacinas da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (www.oie.int).

Os principais testes para diagnosticar a brucelose bovina são: Soroaglutinação Lenta em Tubos(SLT), Soroaglutinação Rápida em Placa(SRP), Teste do Antígeno Acidificado tamponado ou Teste Rosa Bengala (AAT ou TRB), Reação de Fixação do Complemento(FC), Teste do 2-Mercaptoetanol(2-ME), Imunodifusão Radial Dupla, Testes Imunoenzimáticos (ELISA), Teste de Polarização da Fluorescência, Teste do Anel em Leite (TAL), Brucelina, Sêmen-plasma Aglutinação. A quantidade de testes é bastante ampla, sendo assim, cada país de acordo com sua disponibilidade, deve escolher os que melhor se adaptem à sua estratégia (www.oie.int). A OIE admite como teste de referência para comércio internacional e para a confirmação de diagnóstico a reação de FC e como teste de triagem o TRB.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), definiu como teste individual de triagem o AAT e como confirmatórios os testes 2-ME e FC. Permite ainda o TAL para detecção de rebanhos infectados (LAGE, 2006).

Os testes sorológicos são utilizados nas rotinas de certificação de rebanhos livres (www.oie.int).

2.4.2 Métodos diretos

Os métodos diretos de diagnóstico para brucelose são utilizados para confirmação de focos bacteriológicos da doença e caracterização do agente circulante, embora resultados negativos não garantam a ausência da doença.

Classicamente é realizado a partir do isolamento e identificação do agente e suas espécies. Porém, a reação em cadeia pela polimerase também vem sendo muito utilizada como ferramenta para individualizar a *Brucella* spp em materiais suspeitos. Em caso de abortamento, recomenda-se a colheita de conteúdo gástrico, fígado, baço, rins e pulmão do feto abortado e dos linfonodos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, supramamários, do úbere e cotilédone das carcaças de adultos para exame direto. Se o animal suspeito estiver vivo, pode-se tentar isolar a bactéria do leite, de muco vaginal e sêmen. (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

No exame bacteriológico, os materiais suspeitos são semeados em meios de cultura especiais para multiplicação de *Brucella* spp, dentre os meios utilizados destacam-se o Ágar Triptose e o Ágar-Brucella. O crescimento desta bactéria é lento, sendo assim, leva-se de 3 a 7 dias para que as colônias possam ser visualizadas (CARTER; CHENGAPPA, 1991). A identificação das espécies de *Brucella* spp pode ser feita através de provas bioquímicas que identificam diferenças metabólicas entre as espécies e biotipos. As principais provas são: necessidade de CO₂, presença de H₂S, tionina, fucsina básica, aglutinação em soro, tempo de atividade da uréase entre outras (ALTON et al., 1975; METCALF et al., 1994). Uma vantagem deste método direto é a especificidade em detectar a presença da bactéria e as principais desvantagens são os riscos de contaminação acidental em laboratório e o tempo de crescimento bacteriano.

A PCR é uma técnica alternativa ou complementar ao isolamento, capaz de detectar um segmento de DNA específico de *B. abortus* em materiais suspeitos. Suas principais vantagens são: rapidez quando comparada ao isolamento, alta especificidade

pela utilização de *primers* específicos com seqüências de DNA presentes na bactéria e alta sensibilidade (BRICKER, 2002; DAHOUK, 2003; LAGE, 2006). As principais desvantagens deste método são a presença de fatores inibidores do ácido nucléico e o alto custo de equipamentos e reagentes (PAULIN; FERREIRA NETO).

A discriminação das espécies de *Brucella spp* através de métodos moleculares é uma ferramenta epidemiológica muito importante para o controle da brucelose, mas os avanços são lentos pela homogeneidade genética deste gênero de bactérias (WHATMORE et al., 2006). Além disso, estudos genéticos moleculares demonstraram uma associação filogenética da *Brucella spp* com *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum* e *Rhizobium* (ROMERO et al. 1995; DA COSTA et al., 1996; CORBEL, 1997).

A PCR para detecção de *Brucella spp* tem sido cada vez mais estudada.

Fekete et al. (1990), estudaram a sensibilidade e a especificidade diagnóstica da PCR para *Brucella spp* e obtiveram ótimos resultados de especificidade quando, na amplificação, a temperatura de anelamento era de 60°C. Para testar a especificidade da reação, foram extraídos e testados DNA de 17 microorganismos possivelmente associados com infecções em bovinos, já a sensibilidade, foi determinada com diferentes concentrações de DNA de *Brucella spp*. Os resultados de especificidade e sensibilidade da PCR, juntamente com a simplicidade e rapidez do teste, sugeriram uma grande utilidade desta técnica em diagnóstico de rotina para a brucelose.

Baily et al. (1992), propuseram os *primers* B4 e B5, que amplificam um fragmento de 223 pares de bases (bp) a partir do gene codificador da proteína periplásmica imunogênica denominada BCSP31, de 31KDa de massa molecular. Este gene está presente em todas as espécies de *Brucella spp*. *B. melitensis* e *B. abortus* quanto à sensibilidade da reação e ao produto amplificado.

Os *primers* B4 e B5, que amplificam uma seqüência de 223 bp do antígeno de *Brucella abortus*, foram também utilizados em amostras de soro e sangue humano e produziram uma boa resposta para diagnóstico confirmatório de brucelose humana através da PCR (MATAR et al., 1996; ZERVA et al., 2001).

A PCR foi utilizada para detectar as espécies de *Brucella spp* presentes em útero, baço, linfonodos, rins de três vacas naturalmente infectadas com brucelose. Os resultados da PCR foram comparados com os resultados da bacteriologia. Todas as 18 amostras testadas reagiram positivamente pela PCR, porém em 5 delas as bandas esperadas

foram fracas. Estas mesmas 5 amostras foram negativas para o cultivo bacteriano, enquanto o restante das amostras foram positivas (GALLIEN et al., 1998).

Amostras de conteúdo estomacal de fetos abortados de ovelhas foram submetidas tanto ao cultivo quanto à extração do DNA pelo ciclo de fervura e congelamento antecedendo a PCR. Os resultados indicaram uma sensibilidade melhor da PCR, mostrando que a aplicação desta técnica pode ser promissora na identificação de animais infectados e assim, possivelmente substituir, os trabalhosos e demorados testes convencionais (ÇETINKAIA et al., 1999).

A PCR foi utilizada para diagnosticar a brucelose caprina e comparar a sensibilidade de algumas técnicas sorológicas e bacteriológicas rotineiramente usadas. Amostras de leite e sangue, de animais clinicamente saudáveis provenientes do México foram utilizadas para cultura microbiológica e extração do DNA pelo protocolo da proteinase K. Os soros foram testados com antígeno Rosa Bengala (RBT). Os resultados mostraram que 86% das amostras sanguíneas foram positivas para o teste da PCR, enquanto 60% foram positivas para o teste sorológico. A bactéria foi isolada somente em 1 cultura sanguínea. 64% das amostras de leite foram positivas para a PCR, mas fracassaram na cultura bacteriana. Testes bioquímicos e a PCR, demonstraram que a infecção estava associada com *Brucella abortus* biovar 1. O estudo demonstrou que a sensibilidade da PCR é superior a do RBT e a da cultura sanguínea, portanto a PCR é uma ferramenta de rápida identificação de cepas e espécies de *Brucella* (LEAL-KLEVEZAS et al., 2000).

Cortez et al. (2001), realizaram um estudo para padronização da técnica da PCR em amostras clínicas e experimentalmente infectadas de abortos bovinos. Na amplificação, utilizaram os *primers* B4 e B5 descritos por Baily et al. (1992). Os resultados apontam “boa” concordância entre a PCR e o cultivo de *Brucella* ($k=0,73$), sendo que 7 amostras foram positivas tanto para o cultivo quanto para a PCR e 4 de 54 amostras negativas para cultivo, foram positivas para a PCR. Ambos os métodos testados para a extração do DNA (lise pela fervura e lise enzimática pela proteinase K) mostraram-se eficazes quanto à sensibilidade.

Um estudo foi realizado por Richtzenhain et al. (2002), com o objetivo de desenvolver um multiplex PCR (mPCR) para detecção de *Brucella* spp e *Leptospira* spp. Foram utilizados para a amplificação, os *primers* B4 e B5. O mPCR foi testado em 2 grupos de amostras clínicas: 1) 63 episódios de abortos em bovinos experimentalmente contaminados 2) 8 Hamsters infectados com *Leptospira* spp. De acordo com as

referências para o isolamento microbiológico, o teste mostrou 100% de sensibilidade em ambos os grupos. Em 7 amostras coletadas de fetos abortados, as culturas foram negativas para *Brucella* spp, e positivas para o mPCR. O protocolo de fervura mostrou melhores resultados para algumas amostras clínicas, provavelmente, através do aquecimento ocorreu remoção de inibidores da PCR. A alta sensibilidade, simplicidade e a possibilidade de detecção da bactéria, possibilita o uso do mPCR em diagnóstico de rotina.

Padilla et al. (2003), realizaram um estudo de padronização da PCR para detecção de *Brucella* spp. Utilizaram dois métodos de extração de DNA: fenol-clorofórmio-alcool isoamílico e um kit comercial. Para determinarem a sensibilidade da prova, utilizaram 8 cepas peruanas de *Brucella* spp e para especificidade usaram cepas peruanas de outras bactérias. Como resultado obtiveram efetividade nos dois métodos de extração, com alta sensibilidade analítica da prova. A PCR detectou todas as cepas peruanas de *Brucella* spp e foi negativa para as outras bactérias. Desta maneira, uma PCR mais sensível e específica foi padronizada em laboratório para cepas peruanas de *Brucella* spp.

Seonádh et al. (2006), desenvolveram um estudo de avaliação da viabilidade do convencional e da PCR em tempo real como ferramenta diagnóstica para detecção de *Brucella abortus* em vacas naturalmente infectadas. Amostras de leite, sangue e tecidos linfáticos foram coletados de animais naturalmente infectados. A *B. abortus* não foi detectada nas amostras de sangue coletadas de vacas naturalmente infectadas pelo convencional ou pela PCR em tempo real. Não existiu diferença entre a PCR e os métodos bacteriológicos.

2.5 CONTROLE

As estratégias de controle da brucelose visam a redução constante do número de focos da doença. Basicamente, isso é feito com a vacinação das fêmeas, o controle do trânsito dos animais de reprodução e a certificação de rebanhos livres, realizada pelo diagnóstico sistemático dos animais de reprodução, seguido do sacrifício dos positivos, combinados com medidas ambientais. O propósito da vacinação é reduzir a prevalência da doença com baixo custo. Os melhores resultados são alcançados quando cerca de 80% das fêmeas em idade de procriar estiverem imunizadas. A experiência internacional mostrou que quando essa cobertura vacinal for alcançada, a prevalência dos animais será inferior a 2% (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A vacina mais utilizada nos programas de controle é a B19, uma amostra lisa de *B.abortus*, naturalmente atenuada, que induz formação de anticorpos contra LPS liso, podendo interferir no diagnóstico da doença. A presença destes anticorpos está relacionada com a idade da vacinação, por isso, esta vacina deve ser empregada somente em fêmeas jovens com até 8 meses de idade. Não se recomenda a vacinação de machos ou fêmeas em gestação. Em meados dos anos 1990 foi desenvolvida uma nova vacina, a RB51, uma amostra de *B. abortus* rugosa, atenuada, originária de cepa 2308, que diminuiu sua virulência após sofrer inúmeras passagens em meio contendo rifampicina. Por ser rugosa, não provoca formação de anticorpos contra LPS liso, desta forma, não interfere no diagnóstico sorológico da doença (LAGE, 2006). Alguns países já permitem a sua utilização, em combinação ou não com a B19.

Atingida uma situação de baixa prevalência, a vacinação torna-se desnecessária, e as estratégias de controle devem ser trocadas pelas de erradicação, cujo objetivo passa a ser não apenas diminuição constante do número de focos, mas a eliminação de todos os focos. Dentre as estratégias de erradicação, destaca-se a detecção dos focos residuais. Essa detecção pode ser feita de várias maneiras: pesquisa de anticorpos no leite, sorologia em animais de reprodução descartados em abatedouro, sorologia para a movimentação de animais de reprodução, estudos por amostragem, busca ativa nos produtores informais, investigação de denúncias ou rumores, investigação de casos de brucelose humana, investigação de propriedades que mantém relação epidemiológica com o foco e, finalmente, investigação de abortos bovinos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

O ideal é que seja feita uma investigação bacteriológica nos abortos bovinos antes da intervenção na propriedade. Em caso de resultado positivo, haverá certeza da condição de foco da propriedade. A PCR pode melhorar a performance desse diagnóstico.

3 OBJETIVO

Comparar vários protocolos de extração de DNA em quatro distintos órgãos (pulmão, fígado, baço e linfonodo bronquial) provenientes de fetos abortados e bezerros nascidos de vacas experimentalmente infectadas com a B. abortus 2308 por volta do quinto mês de gestação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PADRÕES OURO

Os grupos de padrões ouro, tanto positivo quanto negativo, são amostras de homogeneizado de órgãos originadas de um experimento de teste clínico de vacinas realizado no Laboratório de Zoonoses bacterianas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) denominado “Avaliação de vacina contra brucelose bovina não indutora de anticorpos (VNIA)”, financiado pela FAPESP (Protocolo N° 296/2003). Todas as amostras a serem examinadas foram provenientes de fetos abortados ou bezerros nascidos prematuros de vacas desafiadas com a *B. abortus* 2308 por volta do quinto mês de gestação.

O grupo padrão ouro positivo foi composto por 17 amostras de pulmões, 11 de baços, 8 de fígados e 7 de linfonodos bronquiais. O grupo padrão ouro negativo foi composto por 15 amostras de cada um desses mesmos órgãos dos quais não se logrou o isolamento de *B. abortus* 2308.

4.2 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS

O ensaio de culturas puras da cepa 2308 de *Brucella abortus* foi realizado a partir do repique inicial da bactéria, em meio de cultura de ágar triptose com adição de soro fetal bovino 5%.

Para iniciar as diluições de *Brucella*, foi coletada uma alçada do repique inicial e colocada em salina até que apresentasse a mesma turvação da escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ bactérias.

A partir desta concentração de 10^8 (equivalente à escala 0,5), foram feitas diluições até escala de 10^{-10} , ou seja, 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , da seguinte maneira:

- Após adição da bactéria no tubo inicial contendo 9 mL de salina, transferiu-se 1 mL da solução contendo bactéria de um tubo para outro, cada um também com 9 mL de salina até a menor diluição que no caso deste trabalho foi 10^{-10} .
- 100 µL de cada uma das diluições foi cultivado em placas com meio de Ágar Triptose e após 4 dias observou-se o crescimento bacteriano.

- 400 μ L de cada uma das diluições foram utilizados para extração de DNA por cada um dos protocolos testados neste projeto e seus respectivos PCR.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

Todas as amostras tanto infectadas quanto não infectadas serão submetidas a 4 diferentes protocolos para extração de DNA.

4.3.1 Protocolo 1 – Lise enzimática por Proteinase K e fenol:clorofórmio - PK (adaptado de Leal et al., 1995)

A reação foi realizada em microtubos de 1500 μ L.

- Adicionar 400 μ L da amostra previamente homogeneizada.
- Adicionar 400 μ L de TE em controles negativos.
- Adicionar 1000 μ L de TE em cada amostra.
- Agitar por 10 segundo em vórtex.
- Centrifugar a 13000 x g/ 5 minutos.
- Desprezar o sobrenadante (repetir este procedimento até a suspensão ficar límpida).
- Ressuspender o sedimento em 300 μ L de tampão de lise [10 μ L de pK 20 units/mg, 50 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 %, 5 μ L Tris-HCL 1M, 25 μ L EDTA 0,5 M, 10 μ L NaCL 5M e 400 μ L de água ultrapura].
- Incubar em banho-seco a 37° C/overnight a 600 rpm.
- Adicionar 500 μ L de fenol.
- Agitar por 20 segundos em vórtex.

- Centrifugar a 13000 x g/5 minutos.
- Transferir 300 μ L da fase aquosa para novo tubo de 1500 μ L, tomando-se cuidado de não aspirar à interface orgânica.
- Adicionar 300 μ L fenol-clorofórmio (150 μ L de fenol + 150 μ L de clorofórmio).
- Agitar por 10 segundos em vórtex.
- Centrifugar 13000 x g/ 5 minutos.
- Transferir 200 μ L da fase aquosa para novo tubo de 1500 μ L, tomando-se cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Adicionar 200 μ L de propanol.
- Homogeneizar por inversão.
- Manter a -20°C por 4 horas.
- Centrifugar a 13000 x g/ 30 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e acrescentar 500 μ L de etanol 70 %.
- Centrifugar a 13000 x g/ 30 minutos.
- Descartar o sobrenadante por inversão e deixar secar a temperatura ambiente.
- Adicionar 30 μ L de TE pH 8,0.
- Incubar em banho - seco à 56°C /15 minutos.
- Estocar a -20°C .

4.3.2 Protocolo 2 – Isotiocianato de Guanidina - GT (adaptado de CHOMKZYNSKI, 1993)

- Colocar 400 μ L amostra + 900 μ L de GT (60g de isotiocianato de guanidina + 5 mL de TRIS-HCl 1M pH 7,5 + 10 mL de EDTA 0,25 M pH 8,0 + 100 mL de fenol + ddH₂O qsp 100 mL) em um novo microtubo de 1500 μ L.
- Vórtex 15 segundos → aguardar 10 minutos com novo vórtex ao final → spin.
- Acrescentar 200 μ L clorofórmio → vórtex 15 segundos → descansar 10 minutos.
- Centrifugar 12000 G por 5 minutos.
- Recuperar o sobrenadante (700 μ L) e adicionar igual volume de propanol (700 μ L – para insolubilizar o DNA)- homogeneizar manualmente.
- Congelar à -20°C por 2 horas.
- Centrifugar 12000 G por 20 minutos.
- Desprezar o material com cuidado.
- Colocar 500 μ L etanol 70% → homogeneizar manualmente.

- Centrifugar 12000 G por 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente sobre um papel toalha.
- Adicionar 30 μ L de TE → vórtex → spin rápido.
- Banho seco 56° C por 15 minutos.
- Acondicionar em freezer –20°C.

4.3.3 Protocolo 3- Boom (adaptado de Boom et al.,1990).

- Transferir 400 μ L do homogeneizado para um microtubo de 1500 μ L.
- Adicionar 1000 μ L de tampão de lise (120 g GuSCN - 10 mL de 1 M TRIS-HCL pH 6,4 – 8,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 – 1 mL Triton x100) .
- Homogeneizar por 2 minutos em vórtex.
- Acrescentar 40 μ L da suspensão carreadora (1 g de *Diatomaceous earth* – 50 μ L de HCL 37% - 5 mL de água ultrapura).
- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Deixar descansar por 20 minutos.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2 minutos a 4°C.
- Remover o sobrenadante cuidadosamente.
- Adicionar 500 μ L do tampão de lavagem (120g de GuSCN - 10 mL de 1M TRIS-HCL pH 6,4 e 100 mL de água ultrapura) ao pellet.
- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 500 μ L do tampão de lavagem ao pellet.
- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 500 μ L de etanol 70%.
- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 500 μ L de etanol 70%.

- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 500 µl de acetona.
- Homogeneizar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 2,5 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.
- Deixar tubo aberto em estufa de 37° C/ por no mínimo 30 minutos.
- Adicionar 150 µL de tampão de eluição (1 mL de TRIS-HCL 1M – 0,2 mL de EDTA pH 8,0 e 98,8 mL de água ultrapura).
- Agitar por 1 minuto em vórtex.
- Incubar em banho seco à 55° C/ 10 minutos.
- Agitar por 1 minuto em vórtex.
- Centrifugar a 12800 x g/ 5 minutos.
- Transferir 90 µL da fase aquosa para novo tubo de 1500 µL tomando-se cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Centrifugar a 12800 x g/ 5 minutos.
- Estocar a temperatura de – 20° C.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Alíquotas da solução de DNA de cada amostra-padrão oriunda do ensaio de culturas puras, bem como alíquotas da solução de DNA obtidas das amostras de homogeneizado de órgãos para os três protocolos de extração de DNA, foram diluídas 1:100 em água ultrapura obtida em aparelho Milli-Q-Millipore INC (Billerica MA USA) e submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU® 640 (BECKMAN, FULLERTON, CA, USA). A quantificação foi realizada para avaliar a qualidade e a concentração de DNA como realizada por Vieira (2004).

4.5 AMPLIFICAÇÃO E “*PRIMERS*”

Foram utilizados para a amplificação o par de *primers* B₄ e B₅ (Quadro 1) descritos por Baily et al. (1992), que podem ser observados no quadro 1. Estes *primers* amplificam um fragmento de 223 bp.

<i>PRIMERS</i>	SEQUÊNCIA
B ₄	5' TGGCTCGGTTGCCAATATCAA 3'
B ₅	3' CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG 5'

Quadro 1 Sequência dos *primers* utilizados para o diagnóstico de brucelose, através do gene codificador de 31 kDa da proteína de membrana da *Brucella* - São Paulo - 2008

A amplificação do DNA da bactéria *Brucella abortus* foi feita através do protocolo de CORTEZ et al (2001):

4.5.1 Para o protocolo da Proteinase K:

- 22,5 µL de água ultrapura
- 5 µL de tampão de reação 10 X (500 nM KCL; 15 nM MgCl₂, 100 nM Tris- HCL, pH 9,0)
- 8,0 µL da mistura de dNTPs (200 nM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP])
- 1,5 µL de MgCl₂ (50 nM)
- 5 µL do *primer* B₄ (10 pmol/ µL)
- 5 µL do *primer* B₅ (10 pmol/ µL)
- 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por µL)
- 2,5 µL da amostra de DNA extraído

4.5.2 Para o protocolo GT:

- 22,5 µL de água ultrapura
- 5 µL de tampão de reação 10 X (500 nM KCL; 15 nM MgCl₂, 100 nM Tris- HCL, pH 9,0)
- 8,0 µL da mistura de dNTPs (200 nM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP])
- 1,5 µL de MgCl₂ (50 nM)
- 5 µL do *primer* B₄ (10 pmol/ µL)
- 5 µL do *primer* B₅ (10 pmol/ µL)

- 0,5 μL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por μL)
- 2,5 μL da amostra de DNA diluído em TE na proporção 1:5, ou seja 2 μL DNA + 6 μL de TE.

4.5.3 Para o protocolo do Boom:

- 20 μL de água ultrapura
- 5 μL de tampão de reação 10 X (500 nM KCL; 15 nM MgCl_2 , 100 nM Tris- HCL, pH 9,0)
- 8,0 μL da mistura de dNTPs (200 nM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP])
- 1,5 μL de MgCl_2 (50 nM)
- 5 μL do *primer* B₄ (10 pmol/ μL)
- 5 μL do *primer* B₅ (10 pmol/ μL)
- 0,5 μL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por μL)
- 5 μL da amostra de DNA

4.5.4 Para as amplificações foi adotado o seguinte ciclo, descrito por BAILY et al. (1992):

- Desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos
- Desnaturação do DNA: 94° C por 1 minuto – repetir 40 vezes
- Hibridização: 60°C por 1 minuto – repetir 40 vezes
- Extensão: 72°C por 1 minuto – repetir 40 vezes
- Extensão final: 72°C por 10 minutos

4.6 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

A visualização do produto amplificado foi realizada através da técnica de eletroforese, em uma cuba horizontal, usando tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8,0), agarose a 1,5% (p/v) e uma voltagem constante de 6-7 V/cm.

A imersão do gel foi feita, em uma solução de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio por 20 minutos, e posterior observação em transiluminador ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989). As bandas visualizadas foram comparadas com um padrão de peso molecular de fragmentos múltiplos de 100 pares de base.

4.7 CONTROLES

Foram tomadas precauções para evitar a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório com material genético (DIEFFENBACH et al., 1995), diminuindo-se dessa forma o risco de falsos positivos na reação. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

4.8 TRATAMENTO DOS DADOS

Para cada um dos protocolos foram calculados os valores da sensibilidade e especificidade diagnóstica. As comparações de médias foram feitas considerando-se amostras pareadas. Para as amostras com distribuição normal foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas e Tukey Kramer como pós-teste. Para as amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Friedman e Dunn como pós-teste. O grau de correlação foi medido pelo coeficiente de correlação de Pearson. As comparações de proporções foram feitas pelo teste qui-quadrado.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS

A tabela 1 traz os resultados da sensibilidade analítica obtida para cada um dos métodos de extração de DNA. As tabelas 2 e 4 mostram os resultados da quantificação de DNA e da razão das quantidades de DNA obtidas utilizando-se diferentes absorbâncias, respectivamente.

Tabela 1- Resultados do isolamento e da detecção de *Brucella abortus* 2308 pela PCR para três protocolos de extração de DNA, segundo diferentes concentrações bacterianas - São Paulo – 2008

Número de bactérias /mL *	Isolamento <i>Brucella abortus</i>	Protocolos de extração de DNA		
		PK	GT	BOOM
10^8	+	+	+	+
10^7	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+
10^5	+	+	+	+
10^4	+	+	-	+
10^3	+	+	-	+
10^2	+	+	-	+
10^1	+	+	-	+
10^0	-	+	-	-
10^{-1}	-	+	-	-
10^{-2}	-	+	-	-
10^{-3}	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-
10^{-10}	-	-	-	-

* foi preparada suspensão de colônias com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland (10^8 bactérias/mL) e a partir desta foram feitas diluições de razão 10.

As amostras entre 10^8 a 10^4 bactérias/mL apresentaram incontável número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos cultivos quantitativos e as amostras com 10^3 , 10^2 e 10^1 bactérias/mL apresentaram 4.200, 240 e 50 UFC/mL. As amostras de 10^0 até 10^{-10} bactérias/mL não apresentaram crescimento.

Tabela 2- Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de *Brucella abortus* 2308 obtidas por três protocolos de extração de DNA, segundo diferentes concentrações bacterianas - São Paulo – 2008

Número de bactérias /mL*	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
10^8	12,09	7,50	10,11
10^7	6,56	5,01	0,64
10^6	1,09	15,81	0,57
10^5	5,14	2,40	0,55
10^4	2,61	5,25	12,02
10^3	7,09	13,49	11,85
10^2	13,61	10,31	2,25
10^1	0,18	3,05	0,75
10^0	12,39	3,78	0,29
10^{-1}	10,90	10,68	2,71
10^{-2}	15,59	8,05	4,15
10^{-3}	13,91	8,62	0,86
10^{-4}	3,17	15,36	0,38
10^{-5}	14,27	9,57	2,14
10^{-6}	2,24	5,92	0,29
10^{-7}	2,00	12,43	0,82
10^{-8}	2,40	25,43	3,13
10^{-9}	7,43	6,69	0,97
10^{-10}	3,97	5,91	1,79
Média	7,19	9,23	2,96
Desvio padrão	5,19	5,56	3,89

* foi preparada suspensão de colônias com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland (10^8 bactérias/mL) e a partir desta foram feitas diluições de razão 10.

A comparação das médias de DNA extraído mostrou que o protocolo de Boom apresentou um resultado inferior que o PK ($p < 0,05$) e que o GT ($p < 0,01$).

Os gráficos 1, 2 e 3 mostram que não houve associação entre a concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtida na extração e a concentração de bactérias/mL para os três protocolos estudados.

Gráfico 1 - Correlação entre a concentração de *Brucella abortus*/mL e a concentração de DNA (µg/mL) extraída pelo protocolo PK - São Paulo – 2008

Gráfico 2 – Correlação entre a concentração de *Brucella abortus*/mL e a concentração de DNA (µg/mL) extraída pelo protocolo GT - São Paulo – 2008

Gráfico 3 – Correlação entre a concentração de *Brucella abortus*/mL e a concentração de DNA (µg/mL) extraída pelo protocolo do Boom - São Paulo – 2008

O gráfico 4 e a tabela 3 mostram que entre os três protocolos de extração de DNA não existiu correlação entre as concentrações de *Brucella abortus* (µg/mL) obtidas.

Gráfico 4 – Correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) verificadas por três protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus*, São Paulo- 2008.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson referente à comparação das concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* - São Paulo- 2008

	GT	Boom
PK	-0,175	0,102
GT		0,063

Tabela 4- Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA , segundo diferentes concentrações de *Brucella abortus* - São Paulo – 2008

Número de bactérias /mL	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
10^8	1,18	1,74	1,11
10^7	1,08	1,62	1,23
10^6	1,09	1,59	1,15
10^5	1,17	1,48	0,98
10^4	1,86	1,27	1,10
10^3	1,42	1,84	1,10
10^2	1,21	1,69	1,00
10^1	1,19	1,23	0,87
10^0	1,13	1,46	1,11
10^{-1}	1,13	1,69	1,02
10^{-2}	1,15	1,15	0,94
10^{-3}	1,13	1,38	0,76
10^{-4}	1,23	1,78	0,73
10^{-5}	1,16	1,20	1,22
10^{-6}	1,90	1,50	0,68
10^{-7}	1,68	1,70	1,05
10^{-8}	1,65	1,66	1,12
10^{-9}	1,19	1,36	1,06
10^{-10}	1,38	1,40	1,13
Média	1,31	1,51	1,02
Desvio padrão	0,26	0,21	0,01

As médias das razões de absorvância (Tabela 4) para os três protocolos de extração de DNA foram diferentes entre si ($p < 0,001$).

Nos gráficos 5, 6 e 7 pode ser observada a falta de associação entre a razão das absorvâncias (Tabela 4) obtidas por cada um dos protocolos de extração e a quantidade de bactérias/mL presentes nas suspensões.

Gráfico 5 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para o protocolo de extração PK e diferentes concentrações de *Brucella abortus*/mL - São Paulo – 2008.

Gráfico 6 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para o protocolo de extração GT e diferentes concentrações de *Brucella abortus*/mL - São Paulo – 2008

Gráfico 7 – Correlação entre as razões das leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para o protocolo de extração do Boom e diferentes concentrações de *Brucella abortus*/mL - São Paulo – 2008

O gráfico 8 e a tabela 5 demonstram que não existiu nenhuma associação entre os três protocolos de extração de DNA em relação à razão das absorbâncias referidas na tabela 4.

Gráfico 8 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM verificadas por três protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* - São Paulo-2008

Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Pearson resultante da comparação das razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM entre os três protocolo de extração de DNA de *Brucella abortus* - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,06	-0,168
GT		0,041

5.2 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

5.2.1 Admitindo como *gold standard* o isolamento

Resultados comparativos entre o isolamento clássico e a PCR com três diferentes protocolos de extração de DNA para a detecção de *B. abortus*, em amostras de pulmão de fetos abortados bovinos, podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da detecção de *Brucella abortus* pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Pulmão	Isolamento <i>Brucella abortus</i>	Protocolos de extração de DNA		
		PK	GT	BOOM
B08	-	-	-	-
B09	-	-	-	+
B10	-	+	-	+
B11	+	+	+	+
B13	-	+	-	+
B14	-	-	-	+
B20	+	+	+	+
B22	-	-	-	-
B27	+	+	+	+
B28	-	-	-	-
B32	+	+	+	+
B41	-	-	+	+
B43	-	-	-	-
B48	-	-	-	+
B54	+	+	+	+
B55	+	+	+	+
B63	+	+	+	+
B65	-	-	-	-
B67	-	-	-	+
B69	+	+	+	+
B74	+	+	+	+
B80	+	+	+	+
B85	+	+	-	+
B88	+	+	+	+
B92	+	+	+	+
B99	+	+	+	+
B100	+	+	+	+
B205	-	+	+	+
B208	+	+	-	+
B216	-	-	-	+
B217	-	+	-	+
B234	+	+	-	-

Tabela 7- Razão entre as leituras de absorbância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de pulmão de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008.

Amostras Pulmão	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	1,27	1,94	1,11
B09	1,46	1,91	1,10
B10	1,74	1,98	1,25
B11	1,68	1,91	1,13
B13	1,28	1,89	1,15
B14	1,90	1,45	1,20
B20	1,28	1,90	1,19
B22	1,43	1,92	1,37
B27	1,73	1,90	1,22
B28	1,82	1,95	1,28
B32	1,67	1,88	1,22
B41	1,82	1,95	1,18
B43	1,44	1,87	1,21
B48	1,45	1,98	1,21
B54	1,21	1,93	1,18
B55	1,76	1,93	1,19
B63	1,55	1,85	1,24
B65	1,80	1,93	1,25
B67	1,61	1,78	1,16
B69	1,79	1,89	1,22
B74	1,55	1,90	1,19
B80	1,85	1,92	1,19
B85	1,80	1,92	1,09
B88	1,85	1,93	1,51
B92	1,83	1,89	1,18
B99	1,84	1,90	1,19
B100	1,79	1,94	1,20
B205	1,61	1,88	1,16
B208	1,82	1,92	1,18
B216	1,73	1,93	1,18
B217	1,81	1,89	1,17
B234	1,54	1,92	1,18
Média	1,65	1,90	1,20
Desvio Padrão	0,20	0,09	0,08

Para pulmões de fetos abortados de bovinos, as médias das razões de absorbância (Tabela 7) para os três protocolos de extração de DNA foram diferentes entre si ($p < 0,001$).

O gráfico 9 e a tabela 8 demonstram que para pulmões de fetos abortados de bovinos não houve associação entre os três protocolos de extração de DNA em relação à razão das absorvâncias (Tabela 7).

Gráfico 9— Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em pulmão de fetos abortados de bovinos - São Paulo - 2008

Tabela 8 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em pulmão de fetos abortados de bovinos - São Paulo - 2008

	GT	Boom
PK	-0,146	0,139
GT		0,097

Tabela 9- Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de pulmão de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008.

Amostras Pulmão	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	41,83	99,07	15,69
B09	68,73	166,12	12,69
B10	44,57	68,72	12,91
B11	37,10	407,37	16,68
B13	41,07	56,13	13,03
B14	58,07	280,45	11,70
B20	1,64	332,81	15,18
B22	57,41	163,99	16,29
B27	223,11	623,41	15,29
B28	182,68	515,15	10,83
B32	155,17	212,11	14,27
B41	84,71	907,99	16,83
B43	59,94	193,93	15,07
B48	65,22	122,86	12,26
B54	3,13	329,35	8,74
B55	50,44	477,08	13,42
B63	99,17	129,26	13,52
B65	74,70	321,30	10,28
B67	20,97	129,12	11,65
B69	62,14	255,09	15,22
B74	80,10	144,99	11,60
B80	149,27	307,82	13,79
B85	49,50	312,09	0,40
B88	53,21	99,60	0,26
B92	94,20	259,02	14,53
B99	87,58	250,47	14,18
B100	105,97	783,33	13,42
B205	19,46	141,22	10,56
B208	57,02	574,03	16,61
B216	58,68	107,76	12,80
B217	47,68	197,15	10,79
B234	90,10	381,79	9,83
Média	72,64	292,21	12,51
Desvio Padrão	48,55	206,46	3,83

Para pulmões de fetos abortados de bovinos, a média das concentrações de DNA extraído pelo protocolo GT foi maior que aquelas obtidas pelos protocolos PK e Boom ($p < 0,001$, Tabela 9).

O gráfico 10 e a tabela 10 mostram que para pulmões de fetos abortados de bovinos não existiu correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos três protocolos de extração.

Gráfico 10 – Correlação entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de amostras de pulmão de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

Tabela 10 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de pulmão de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,384	0,158
GT		0,239

Resultados comparativos entre o isolamento clássico e a PCR com três diferentes protocolos de extração de DNA para a detecção de *B. abortus*, em amostras de baço de fetos abortados bovinos, podem ser observados na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados da detecção de *Brucella abortus* pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de baço de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Baço	Isolamento <i>Brucella abortus</i>	Protocolos de extração de DNA		
		PK	GT	BOOM
B08	-	-	-	+
B09	-	-	-	-
B10	-	-	-	-
B13	-	-	-	+
B14	-	-	-	-
B20	+	+	+	+
B22	-	-	-	+
B28	-	-	-	+
B32	+	+	+	+
B41	-	-	-	+
B43	-	-	-	-
B48	-	-	-	+
B49	+	+	+	+
B54	+	+	+	+
B63	+	+	+	+
B65	-	-	-	-
B67	-	-	-	+
B74	+	+	+	+
B80	+	+	+	+
B88	+	+	+	+
B100	+	+	+	+
B104	+	+	+	+
B205	-	-	-	+
B216	-	-	-	+
B217	-	-	-	+
B234	+	+	+	+

Tabela 12 - Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de baço de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008

Amostras Baço	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	1,64	1,96	0,83
B09	1,77	1,88	1,12
B10	1,90	1,82	1,18
B13	1,73	1,94	1,19
B14	1,65	1,97	1,14
B20	1,79	1,90	1,18
B22	1,65	1,93	1,15
B28	1,84	1,95	1,19
B32	1,46	1,92	1,28
B41	1,82	1,91	1,23
B43	1,75	1,95	1,18
B48	1,85	1,96	1,23
B49	1,66	1,92	1,15
B54	1,28	1,89	1,18
B63	1,74	1,98	1,11
B65	1,77	1,91	1,12
B67	1,89	1,91	1,17
B74	1,71	1,92	1,14
B80	1,79	1,92	1,27
B88	1,90	1,98	1,39
B100	1,80	1,91	1,15
B104	1,77	1,91	1,17
B205	1,83	1,91	1,12
B216	1,86	1,88	1,16
B217	1,80	1,93	1,21
B234	1,68	1,95	1,12
Média	1,74	1,92	1,17
Desvio Padrão	0,14	0,04	0,09

Para baços de fetos abortados de bovinos, as médias das razões de absorvância (Tabela 12) para os três protocolos de extração de DNA foram diferentes entre si ($p < 0,001$).

O gráfico 11 e a tabela 13 demonstram que para baços de fetos abortados de bovinos não houve associação entre os três protocolos de extração de DNA em relação à razão das absorvâncias (Tabela 12).

Gráfico 11 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em baço de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

Tabela 13 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em baço de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	-0,062	0,181
GT		-0,017

Tabela 14 - Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de baço de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Baço	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	124,32	518,35	14,38
B09	235,41	1311,82	10,51
B10	509,35	1654,94	12,88
B13	179,61	550,37	16,77
B14	140,62	1351,63	12,32
B20	9,20	469,86	14,71
B22	110,84	792,23	14,06
B28	213,09	1162,98	12,69
B32	67,51	455,21	13,35
B41	155,28	278,57	12,47
B43	249,75	839,13	14,24
B48	403,86	939,67	14,03
B49	132,03	1290,09	12,52
B54	5,42	230,73	3,65
B63	15,35	289,60	22,34
B65	58,73	596,00	11,03
B67	243,10	1022,03	14,84
B74	172,91	1424,02	14,73
B80	42,33	468,29	14,68
B88	463,12	1636,05	0,77
B100	58,54	563,11	12,51
B104	45,84	704,59	13,88
B205	118,96	1080,89	12,20
B216	114,44	1246,20	15,99
B217	125,01	983,93	11,50
B234	170,50	978,96	12,57
Média	160,20	878,43	12,91
Desvio Padrão	131,29	422,12	3,90

Para baços de fetos abortados de bovinos, a média das concentrações de DNA extraído pelo protocolo GT foi maior que aquelas obtidas pelos protocolos PK e Boom ($p < 0,001$, Tabela 14).

O gráfico 12 e a tabela 15 mostram que para baços de fetos abortados de bovinos existiu uma discreta correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos três protocolos de extração.

Gráfico 12 – Correlação entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de amostras de baço de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

Tabela 15 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de baço de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,692	-0,29
GT		-0,268

Resultados comparativos entre o isolamento clássico e a PCR com três diferentes protocolos de extração de DNA para a detecção de *B. abortus*, em amostras de fígado de fetos abortados bovinos, podem ser observados na tabela 16.

Tabela 16 Resultados da detecção de *Brucella abortus* pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Fígado	Isolamento <i>Brucella abortus</i>	Protocolos de extração de DNA		
		PK	GT	BOOM
B08	-	-	-	+
B09	-	-	-	+
B10	-	-	-	+
B13	-	-	+	-
B14	-	-	-	-
B22	-	-	-	+
B27	+	+	+	+
B28	-	-	-	+
B32	+	+	+	+
B34	+	+	+	-
B41	-	-	+	+
B43	-	-	-	-
B48	-	-	-	+
B54	+	+	+	+
B63	+	+	+	+
B65	-	-	-	-
B67	-	-	+	+
B88	+	+	+	+
B202	+	+	-	-O
B205	-	+	-	+
B208	+	+	+	-
B216	-	-	-	+
B217	-	-	-	-

Tabela 17- Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de fígado de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008

Amostras Fígado	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	1,59	1,99	1,22
B09	1,67	1,84	0,96
B10	1,81	1,94	1,20
B13	1,81	1,97	1,24
B14	1,58	1,76	1,05
B22	1,18	1,88	1,14
B27	1,25	1,87	1,09
B28	1,72	1,81	1,16
B32	1,32	1,91	1,23
B34	1,74	1,74	1,11
B41	1,44	1,81	1,31
B43	1,48	1,86	1,12
B48	1,62	1,74	1,10
B54	1,30	1,94	1,20
B63	1,27	1,82	1,12
B65	1,60	1,81	1,24
B67	1,78	1,90	1,25
B88	1,80	1,95	1,27
B202	1,52	1,68	1,12
B205	1,78	1,93	1,17
B208	1,86	1,93	1,02
B216	1,76	1,75	1,09
B217	1,72	1,95	1,10
Média	1,59	1,86	1,15
Desvio Padrão	0,21	0,09	0,09

Para fígados de fetos abortados de bovinos, as médias das razões de absorvância (Tabela 17) para os três protocolos de extração de DNA foram diferentes entre si ($p < 0,001$).

O gráfico 13 e a tabela 18 demonstram que para fígados de fetos abortados de bovinos não houve associação entre os três protocolos de extração de DNA em relação à razão das absorvâncias (Tabela 17).

Gráfico 13 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em fígado de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

Tabela 18 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em fígado de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,123	-0,033
GT		0,352

Tabela 19 - Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de fígado de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Fígado	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B08	102,30	676,90	15,73
B09	47,02	903,91	14,28
B10	139,04	1006,41	12,79
B13	331,24	816,61	13,88
B14	130,67	904,65	11,71
B22	28,08	921,46	15,75
B27	35,54	256,61	14,66
B28	67,10	669,43	14,91
B32	42,25	339,57	13,24
B34	79,46	205,85	14,16
B41	11,56	52,12	13,44
B43	81,78	538,91	14,23
B48	132,47	826,86	13,28
B54	4,26	585,72	2,99
B63	38,90	68,45	15,86
B65	63,23	1057,87	10,26
B67	67,56	674,53	11,01
B88	82,96	970,67	1,68
B202	44,66	925,30	13,68
B205	75,86	593,88	14,92
B208	159,00	1451,20	16,65
B216	66,07	683,52	14,44
B217	31,80	498,11	13,98
Média	80,99	679,50	12,94
Desvio Padrão	68,20	340,16	3,68

Para fígados de fetos abortados de bovinos, a média das concentrações de DNA extraído pelo protocolo GT foi maior que aquelas obtidas pelos protocolos PK e Boom ($p < 0,001$, Tabela 19).

O gráfico 14 e a tabela 20 mostram que para fígados de fetos abortados de bovinos não existiu correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos três protocolos de extração.

Gráfico 14 – Correlação entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de amostras de fígado de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

Tabela 20 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de fígado de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,423	0,139
GT		-0,129

Resultados comparativos entre o isolamento clássico e a PCR com três diferentes protocolos de extração de DNA para a detecção de *B. abortus*, em amostras de linfonodo bronquial de fetos abortados bovinos, podem ser observados na tabela 21.

Tabela 21 - Resultados da detecção de *Brucella abortus* pelo isolamento clássico e pela PCR realizada com três diferentes protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Linfonodo BR	Isolamento <i>Brucella abortus</i>	Protocolos de extração de DNA		
		PK	GT	Boom
B03	+	-	-	+
B08	-	-	-	-
B09	-	-	-	-
B10	-	+	-	-
B13	-	+	-	-
B14	-	-	-	+
B22	-	-	-	-
B27	+	+	+	+
B28	-	+	-	-
B41	-	-	+	+
B43	-	-	-	-
B48	-	-	-	+
B49	+	+	+	+
B54	+	+	+	+
B65	-	-	-	+
B67	-	-	-	-
B74	+	+	+	+
B88	+	+	+	+
B205	-	-	-	+
B216	-	-	-	+
B217	-	-	+	+
B235	+	-	-	-

Tabela 22 - Razão entre as leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nM para três protocolos de extração de DNA, segundo amostras de linfonodo bronquial de fetos abortados bovinos - São Paulo – 2008

Amostras Linfonodo BR	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B03	1,72	1,88	1,16
B08	1,33	1,96	1,13
B09	1,25	1,91	1,18
B10	1,70	1,93	1,20
B13	1,43	1,91	1,26
B14	1,81	1,94	1,25
B22	1,24	1,86	1,16
B27	1,49	1,86	1,28
B28	1,83	1,97	1,34
B41	1,50	1,80	1,08
B43	1,69	1,91	1,23
B48	1,64	1,98	1,17
B49	1,39	1,90	1,26
B54	1,28	1,86	1,81
B65	1,71	1,89	1,18
B67	1,53	1,78	1,09
B74	1,36	1,88	1,19
B88	1,67	1,93	1,46
B205	1,79	1,92	1,21
B216	1,89	1,93	1,25
B217	1,58	1,91	1,19
B235	1,84	1,92	1,21
Média	1,58	1,90	1,24
Desvio Padrão	0,21	0,05	0,15

Para linfonodos bronquiais de fetos abortados de bovinos, as médias das razões de absorvância (Tabela 22) para os três protocolos de extração de DNA foram diferentes entre si ($p < 0,001$).

O gráfico 15 e a tabela 23 demonstram que para linfonodos bronquiais de fetos abortados de bovinos não houve associação entre os três protocolos de extração de DNA em relação à razão das absorvâncias (Tabela 22).

Gráfico 15 – Correlação entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em linfonodo bronquial de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

Tabela 23 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as razões das leituras de absorvância feitas com os comprimentos de onda 260 e 280 nm para três diferentes protocolos de extração de DNA de *Brucella abortus* em linfonodo bronquial de fetos abortados de bovinos - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,382	-0,104
GT		0,094

Tabela 24 - Concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três diferentes protocolos de extração aplicados em amostras de linfonodo bronquial de fetos bovinos abortados - São Paulo – 2008

Amostras Linfonodo Br	Protocolos de extração de DNA		
	PK	GT	BOOM
B03	18,50	216,00	19,31
B08	43,34	121,50	17,02
B09	36,74	45,34	15,68
B10	17,08	103,13	12,64
B13	62,01	123,73	17,08
B14	345,88	1116,10	12,93
B22	32,38	108,69	13,90
B27	70,37	216,70	13,62
B28	60,18	652,58	12,60
B41	17,92	36,72	13,14
B43	145,19	492,33	15,50
B48	158,85	369,42	12,85
B49	52,32	97,90	10,11
B54	3,17	52,68	1,19
B65	19,87	280,78	15,79
B67	89,90	23,91	13,03
B74	45,38	157,94	14,36
B88	28,42	60,66	4,47
B205	60,56	302,34	11,70
B216	401,70	545,02	16,09
B217	18,24	351,31	15,62
B235	132,92	796,40	17,53
Média	84,59	285,05	13,46
Desvio Padrão	103,12	282,74	4,09

Para linfonodos bronquiais de fetos abortados de bovinos, a média das concentrações de DNA extraído pelo protocolo GT foi maior que aquelas obtidas pelos protocolos PK e Boom ($p < 0,001$, Tabela 24).

O gráfico 16 e a tabela 25 mostram que para linfonodos bronquiais de fetos abortados de bovinos existiu uma discreta correlação entre as concentrações de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos três protocolos de extração.

Gráfico 16 – Correlação entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por três protocolos de extração de amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

Tabela 25 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as concentrações de DNA de *Brucella abortus* ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por os três protocolos de extração em de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino - São Paulo – 2008

	GT	Boom
PK	0,712	0,186
GT		0,247

A comparação entre os resultados das PCR para os diferentes protocolos descritos nos itens 4.3.1., 4.3.2, 4.3.3., tomando como referência os resultados obtidos para isolamento das mesmas amostras de acordo com o item 4.1., estão apresentadas nas tabelas ilustradas abaixo (Tabelas 26, 27, 28, 29 e 30).

Tabela 26 – Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008

	Pulmão								
	PK			GT			BOOM		
	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total
PCR +	17	4	21	14	1	15	16	10	26
PCR -	0	11	11	3	14	17	1	5	6
Total	17	15	32	17	15	32	17	15	32

Sensibilidade diagnóstica do método pK = 100%

Especificidade diagnóstica do método pK = 73%

Sensibilidade diagnóstica do método GT = 82%

Especificidade diagnóstica do método GT = 93%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom = 94%

Especificidade diagnóstica do método Boom = 33%

Tabela 27 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de baço de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008

	Baço								
	PK			GT			BOOM		
	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total
PCR +	11	0	11	11	0	11	11	10	21
PCR -	0	15	15	0	15	15	0	5	5
Total	11	15	26	11	15	26	11	15	26

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 100%

Especificidade diagnóstica do método pK: 100%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 100%

Especificidade diagnóstica do método GT: 100%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 100%

Especificidade diagnóstica do método Boom: 33%

Tabela 28 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008

	Fígado								
	PK			GT			BOOM		
	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total
PCR +	8	1	9	7	3	10	5	10	15
PCR -	0	14	14	1	12	13	3	5	8
Total	8	15	23	8	15	23	8	15	23

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 100%

Especificidade diagnóstica do método pK: 93%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 88%

Especificidade diagnóstica do método GT: 80%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 63%

Especificidade diagnóstica do método Boom: 33%

Tabela 29 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008

	Linfonodo Bronquial								
	PK			GT			BOOM		
	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total	Isolado	Não Isolado	Total
PCR +	5	3	8	5	2	7	6	7	13
PCR -	2	12	14	2	13	15	1	8	9
Total	7	15	22	7	15	22	7	15	22

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 71%

Especificidade diagnóstica do método pK: 80%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 71%

Especificidade diagnóstica do método GT: 87%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 86%

Especificidade diagnóstica do método Boom: 53%

Tabela 30 – Resultados consolidados por órgãos de feto abortado de bovino para detecção de *Brucella abortus* pela PCR realizada com três protocolos de extração de DNA, segundo resultados da bacteriologia clássica - São Paulo – 2008

	PK Isolamento positivo	GT Isolamento positivo	BOOM Isolamento positivo
PCR +	41	37	38
PCR -	2	6	5
Total	43	43	43

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 95%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 86%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 88%

5.2.2 Admitindo como *gold standard* a infecção experimental

Os resultados das PCR para os diferentes protocolos de extração de DNA, admitindo que todos os fetos abortados estavam infectados com *B. abortus* estão apresentados nas tabelas 31, 32, 33,34 e 35.

Tabela 31 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de pulmão de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008

	Pulmão		
	PK Infectados experimentalmente	GT Infectados experimentalmente	BOOM Infectados experimentalmente
PCR +	21	16	26
PCR -	11	16	6
Total	32	32	32

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 66%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 50%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 81%

Tabela 32 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de baço de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008

	Baço		
	PK Infectados experimentalmente	GT Infectados experimentalmente	BOOM Infectados experimentalmente
PCR +	11	11	21
PCR -	15	15	5
Total	26	26	26

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 42%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 42%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 81%

Tabela 33 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de fígado de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008

	Fígado		
	PK Infectados experimentalmente	GT Infectados experimentalmente	BOOM Infectados experimentalmente
PCR +	9	10	15
PCR -	14	13	8
Total	23	23	23

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 39%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 43%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 65%

Tabela 34 - Resultados da PCR para detecção de *Brucella abortus* realizada com três protocolos de extração de DNA em amostras de linfonodo bronquial de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 - São Paulo – 2008

	Linfonodo		
	PK Infectados experimentalmente	GT Infectados experimentalmente	BOOM Infectados experimentalmente
PCR +	8	7	13
PCR -	14	15	9
Total	22	22	22

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 36%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 32%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 59%

Tabela 35 - Resultados consolidados por órgãos de feto abortado de bovino experimentalmente infectado com a estirpe 2308 para detecção de *Brucella abortus* pela PCR realizada com três protocolos de extração de DNA - São Paulo – 2008

	PK Infectados experimentalmente	GT Infectados experimentalmente	BOOM Infectados experimentalmente
PCR +	49	44	75
PCR -	54	59	28
Total	103	103	103

Sensibilidade diagnóstica do método pK: 47%

Sensibilidade diagnóstica do método GT: 43%

Sensibilidade diagnóstica do método Boom: 73%

As figuras de 1 a 3 mostram os resultados da amplificação da PCR para os diferentes protocolos de extração de DNA testados.

(1) padrão de peso molecular, 100 bp; (2) controle negativo; (3) controle negativo; (4) amostra de linfonodo bronquial; (5) amostra de pulmão; (6) amostra de baço; (7) amostra de fígado; (8) controle positivo.

Figura 1 – Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração enzimática do DNA por Proteinase K - São Paulo – 2008

(1) padrão de peso molecular, 100 bp; (2) água; (3) controle negativo; (4) controle negativo; (5) controle negativo; (6) controle negativo; (7) amostra de fígado; (8) amostra de pulmão; (9) amostra de linfonodo bronquial; (10) amostra de baço; (11) amostra de fígado; (12) amostra de pulmão; (13) amostra de fígado; (14) amostra de pulmão, (15) amostra de linfonodo bronquial, (16) amostra de linfonodo bronquial, (17) controle positivo.

Figura 2 - Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração do DNA pelo Isotiocianato de Guanidina (GT) - São Paulo – 2008

(1) padrão de peso molecular, 100 bp; (2) água; (3) controle negativo; (4) controle negativo; (5) amostra de baço; (6) amostra de fígado; (7) amostra de pulmão; (8) amostra de linfonodo bronquial; (9) amostra de baço; (10) amostra de fígado; (11) amostra de pulmão; (12) amostra de linfonodo bronquial; (13) amostra de pulmão; (14) controle positivo da extração; (15) controle positivo.

Figura 3 - Gel de agarose mostrando resultado de PCR em amostras de linfonodo bronquial, pulmão, baço e fígado de feto abortado de vacas experimentalmente desafiadas com *Brucella abortus* 2308, utilizando extração do DNA pelo Boom - São Paulo – 2008

6 DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS COM CULTURAS PURAS

O melhor limiar de detecção foi verificado para o protocolo PK (10^{-2} bactérias/mL), seguido do Boom (10^1 bactérias/mL) e GT (10^5 bactérias/mL) (Tabela 1).

Esses resultados indicam que o protocolo PK detectou uma fração de 1/100 de bactéria, o que é incoerente. Isso provavelmente foi consequência da baixa precisão da quantificação pela escala de McFarland. De fato, as contagens de UFC feitas a partir das suspensões examinadas, mostraram um número sempre superior de UFC àquela prevista pela escala. Além disso, é razoável supor que existam UFC produzidas por mais de um bacilo. Em resumo, a escala de McFarland e as contagens de UFC sub-quantificaram o número de bacilos em suspensão.

A tabela 4 mostra que nenhum protocolo alcançou valores entre 1,8 e 2,0 para as médias de razão de absorbância em 260 e 280 nm, preconizado por Sambrook e Russell (2001) para avaliar a pureza do ácido nucléico. Segundo esses autores, valores inferiores a 1,8 podem significar contaminação com proteína ou fenol, além de não permitirem a quantificação precisa do ácido nucléico. Apesar disso, essa quantificação foi realizada, e os resultados constam da Tabela 2, onde se verifica que o protocolo de Boom teve concentrações menores de DNA que o PK ($p < 0,05$) e que o GT ($p < 0,01$).

Os gráficos de 1 a 8 e as tabelas 3 e 5 mostram que, para os três protocolos de extração, não existe associação entre a concentração de DNA ou o grau de pureza do DNA com a quantidade de bactérias presente nas suspensões. Também não existe associação entre os protocolos de extração de DNA no referente às concentrações de DNA ou os graus de pureza do DNA obtidos.

Assim, existem duas possibilidades as serem consideradas: 1) a espectrofotometria, como recomendada por Sambrook e Russell (2001), não é a metodologia ideal para mensuração da concentração de DNA, 2) existe pouca reprodutibilidade nos resultados dos protocolos de extração de DNA.

6.2. ADMITINDO COMO *GOLD STANDARD* O ISOLAMENTO

O baço foi o melhor órgão para detecção de *B. abortus* pela PCR em homogeneizados de órgãos de fetos abortados, seguido do pulmão, do fígado e do linfonodo bronquial, (Tabelas 26 a 29). Foi apenas no baço que a sensibilidade diagnóstica da PCR foi de 100% para qualquer dos protocolos de extração de DNA ensaiados (Tabela 27).

Para os linfonodos, a melhor sensibilidade diagnóstica foi observada para o protocolo de Boom (86%, Tabela 29). Ribeiro (2006) estudou três protocolos de extração para detecção de *Mycobacterium bovis* em homogeneizados de órgãos, sobretudo de linfonodos e verificou que o melhor deles foi o de Boom.

Os resultados consolidados por órgãos mostram que o protocolo de PK foi o mais sensível (Tabela 30). Cortez et al. (2001), observaram que tanto o protocolo da PK quanto o da lise pela fervura foram eficazes para a extração de DNA de *B. abortus*.

A experiência amadurecida com a PCR nos vários laboratórios do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da FMVZ, USP indicava uma expectativa de melhor performance do protocolo de Boom. Entretanto, os resultados frustraram essa expectativa em favor do protocolo de PK (Tab. 30). Esse fato pode ter sido decorrente da permanência de resquícios da suspensão carreadora (*Diatomaceous earth*) na etapa final da extração, fazendo com que o DNA ficasse aderido a ela, não conseguindo eluir-se.

A menor sensibilidade do protocolo GT pode ter sido resultado da presença de uma maior quantidade de fatores de inibição da amplificação do ácido nucléico, como proteínas séricas, debris celulares somáticos, polissacarídes e outros componentes dos fluídos corpóreos (WILSON, 1997), pois para esse método não foi realizada a pré-lavagem das amostras, procedimento que antecedeu a extração no protocolo de PK e foi realizado como etapa intermediária no de Boom.

Nas 60 amostras (15 baços, 15 fígados, 15 linfonodos bronquiais e 15 pulmões) das quais não foi possível isolar *B. abortus* (*gold standard* negativo), a PCR resultou positiva em 8 amostras para o protocolo de extração PK (4 pulmões, 1 fígado e 3 linfonodos), em 6 amostras para o protocolo de extração GT (1 pulmão, 3 fígados e 2 linfonodos) e em 37 amostras (10 pulmões, 10 baços, 10 fígados e 7 linfonodos) para o protocolo de extração do Boom (Tabelas 26 a 29). Nas amostras onde o isolamento foi negativo, a proporção de PCR positivos verificada para o protocolo de extração Boom (37/60) foi superior àquelas verificados para o PK (8/60, $p=0,0054$) e o GT (6/60,

$p=0,0011$). Como todos os animais utilizados no estudo foram gerados por vacas experimentalmente infectadas, é razoável supor que esses resultados da PCR não são falsos positivos, embora o isolamento tenha resultado negativo. Em estudos envolvendo detecção de *B. abortus* em amostras de abortos bovinos, Cortez et al. (2001) detectaram 4 amostras positivas para PCR em 54 negativas para cultivo e Fekete et al. (1990) obtiveram 2 amostras positivas em 52 negativas pelo cultivo microbiológico. A especificidade da PCR não está associada ao protocolo de extração, mas aos *primers* utilizados. No presente experimento foram utilizados os *primers* B4 e B5 descritos por Baily et al. (1992) para detecção de *Brucella abortus* e *Brucella mellitensis*. Esses autores verificaram as seqüências dos *primers* nos bancos de dados para seqüências de nucleotídeos *Genbank* e *EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*) e não identificaram nenhuma significativa homologia de seqüências de outras bactérias com estas da *Brucella*. Estes *primers* foram utilizados com sucesso para o diagnóstico de infecção por brucela por vários autores (Matar et al., 1996; ZERVA et al., 2001; CORTEZ et al., 2001; RICHTZENHAIN et al., 2002), que jamais relataram reações falso positivas. Problema de inespecificidade foi relatado apenas frente à infecção humana por *Ochrobactrum anthropi* (CIESLAK et al., 1992; GRANSDEN; EYKYN, 1992; MANFREDI, 1999; CASANAS et al., 2001).

No estudo dos órgãos, os resultados observados para as mensurações das concentrações de DNA e para as razões de absorbância registradas com leituras em diferentes comprimentos de onda (260 nm/280 nm) foram organizados nas tabelas de 7 a 10, 12 a 15, 17 a 20, 22 a 25 e nos gráficos de 9 a 16. A interpretação desses resultados é exatamente a mesma já feita para as análises com as culturas puras. As duas únicas exceções foram verificadas para os resultados das concentrações de DNA obtidas a partir do baço e do linfonodo bronquial, onde houve correlação discreta entre os resultados dos protocolos de extração de PK e GT (Gráficos 12 e 16 e Tabelas.15 e 25).

Assim, pode-se considerar que dentre os órgãos estudados, uma maior probabilidade de detecção de *B. abortus*, foi verificada no baço. Entretanto, vale ressaltar que uma maior sensibilidade foi alcançada pela utilização da PCR e do isolamento em paralelo.

6.3. ADMITINDO COMO *GOLD STANDARD* A INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Os resultados demonstrados nas tabelas 31, 32, 33, 34 e 35 apontam o Boom como o melhor protocolo de extração do DNA quando se considera que o *gold standard* é a infecção experimental. A sensibilidade diagnóstica neste caso, também apontou o baço como órgão onde é maior a probabilidade de detecção de *Brucella abortus*, dentre os órgãos estudados.

7 CONCLUSÕES

- 1- O protocolo de extração influencia a sensibilidade e a especificidade diagnósticas da PCR aplicada em homogeneizado de órgãos para detecção de *Brucella abortus*.
- 2- O baço apresentou maior probabilidade de detecção de *Brucella abortus* pela PCR do que o pulmão, o fígado e o linfonodo bronquial.
- 3- A melhor estratégia para detectar *Brucella abortus* em tecidos de fetos abortados é a utilização da PCR e do isolamento em paralelo.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: O.P.S., 2001. 28-55 p.
- ALTON, G. G.; JONES M. L.; PIETZ D. E. **Las tecnicas de laboratorio em la brucelosis**. Ginebra: OMS, 1975. p. 79-126.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271-275, 1992.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Planos e Programas. Programas. Área Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT)**. Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 6, de oito de janeiro de 2004. Regulamento PNCEBT. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 de março de 2008.
- BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 435-446, 2002.
- BRICKER, B. J.; EWALT, D. R.; HALLING, S. M. *Brucella* "HOOF- Prints": strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). **BMC Microbiology**, v. 3, p. 15, 2003.
- CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Filadelfia: Lea & Febiger, 1991. p. 196-200.
- CASANAS, M. C.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; RODRIGUEZ-TORRES, A.; ORDUNA, A.; COLMENERO, J. D.; MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31Kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 127-131, 2001.
- ÇETINKAIA, B.; ONGOR, H.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; KALENDER, H.; ERDOGAN, H. M. Detection of *Brucella* species DNA in the Stomach Content of Aborted Sheep Fetuses by PCR. **The Veterinary Record**, v. 144, p. 239-240, 1999.
- CIESLAK, T. J.; ROBB, M. L.; DRABICK, C. J.; FISCHER, G. W. Catheter-associated sepsis caused by *Ochrobactrum anthropi*: report of a case and review of related nonfermentative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 902-907, 1992.
- CHOMKZYNSKI, 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.

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

CIPOLLA, A.; SALUSTIO, E.; BOSCHIROLI, L.; CAMPOS, E.; ODRIOSOLA, E.; CAMPERO, C. L.; SAMARTINO, L.; ROSSETTI, O.; GAGLIARDO, L. Caracterización bioquímica y molecular de cepas de *Brucella abortus* aisladas en Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, 2004.

CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O.; BOUMEDINE, K. S. Classification of Brucella strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 593-602, 2003.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; VIZCAÍNO, N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.1-8, 1996.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an Overview. **1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Isarel**, v. 3, n. 2, 1997.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIM, 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

DA COSTA, M.; GUILLOU, J. P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIÉBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 267-275, 1996.

DAHOUK, S. A.; TOMASO, H.; NOCKLER K.; NEUBAUER H.; FRANGOULIDIS D. Laboratory based diagnosis of brucellosis- A review of the literature. **Clinical Laboratory** v. 49, p. 487-505, 2003.

DIEFFENBACH, C.W.; DRAGON, E.A.; DVEKSLER, G.S. Setting up a PCR laboratory. In: **PCR primer: a laboratory manual**. New York, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, 1995. p. 7-16.

FEKETE, A.; BANTLE, J. A.; HALLING, S. M. DETECTION OF *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinay Investigation**, v. 4, p. 79-83, 1992b.

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

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

GARCÍA-CARRILLO, C. **La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana**. Office International des Épizooties, Paris: 1987. 43-70 p.

GRANSDEN, W. R.; EYKYN, S. J. Seven cases of bacteremia due to *Ochrobactrum anthropi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 1068-1069, 1992.

GULER, L.; GUNDUZ, K.; OK, U. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 53-61, 2003.

IKRAM, M.; HILL, E. **Microbiology for veterinary technicians**, 1. ed. Goleta: American Veterinary Publications, 1991.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT)**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006, 188 p. (Manual Técnico).

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I. O.; GARCÍA-CANTÚ, J.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Use of polimerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 91-97, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I.O.; LOPEZ-MERINO, L.; MARTINEZ-SORIANO, J.P. Single-stpe PCR for detection of *Brucella spp.* From blood and milk of infected animals. **Journal Clinical Microbiology** v. 12, p. 3087-3090, 1995a.

MANFREDI, R.; NANETTI, A.; FERRI, M.; CHIODO, F. Nosocomial sepsis due to *Ochrobactrum anthropi* in HIV positive patients: two case reports. **Le Infezioni in Medicina**, v. 7, n. 2, p. 119-124, 1999.

MARIANELLI, C.; GRAZIANI, C.; SANTANGELO, C.; XIBILIA, M. T.; AMATO, R.; NERI, D.; CUCCIA, M.; RINNONE, S.; DI MARCO, V.; CIUCHINI, F. Molecular Epidemiological and Antibiotic Susceptibility Characterization of *Brucella* Isolates from Humans in Sicily, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2923-2928, 2007.

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

MAURIN, M. La Brucellose à l'aube du 21^o siècle. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 35, p. 6-16, 2005.

MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J. J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. P.; PINTO, M. R. A.; RIBEIRO, M. G.; THIÉBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTUJI, B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brasil. **Veterinary Record**, v. 156, p.147-148, 2005.

MELLO, M. T. **Animal Brucellosis in Brazil**. In: 1950, Washington. **Proceedings of the INTER-AMERICAN CONGRESS ON BRUCELLOSIS**. p. 56-89.

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.

OIE. Organização Internacional de Epizootia. **Bovine Brucellosis**. Article 2.3.1. Terrestrial Animal Health code 2006, part 2, chapter 2.3.1. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 28 de março de 2008.

PADILLA, C. R.; MONTOYA, Y. P.; CARRILLO, C. P. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella sp.* **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 20, n. 2, p.102-104, 2003

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003.

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 *Brucella 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, p. 55-62, 2002.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; PAIXAO, T. A.; SANTOS, R. L.; OLSEN, S. C.; SCHURIG, G. G.; LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine** v. 24, n. 25, p.5327-5534, 2006.

RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J. D.; GLOVER, D. A.; SPLITTER, G. A. Comparative Whole-Genome Hybridization Reveals Genomic Islands in *Brucella* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 15, p. 5040-5051, 2004.

RIBEIRO, D.C. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizado de órgãos**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella spp.* and *Leptospira spp.* DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. **Foodborne Infections and Intoxications**. 3. ed. California: Elsevier Academic Press, 2006, p. 346-347.

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

SALDARRIAGA, O. A; OSSA, J. E.; RUGELES, M. T. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.* **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 15, n. 2, p. 180-187, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SEÓNADH, O. L.; MICHAEL, S.; TORRES, S. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 170-176, 2006.

THOEN, C. O.; ENRIGHT, F. *Brucella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial Infection in Animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1988, p. 160-169.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 607-609.

VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella spp.*, em amostras de sangue de cães naturalmente infectados**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1661-1664, 2001.

WHATMORE, A. M.; SHANKSTER, S.J.; PERRETT, L. L.; MURPHY, T. J.; BREW, S. D.; THIRLWALL, R. E; CUTLER, S. J.; MACMILLAN, A. P. Identification and Characterization of Variable-Number, Tandem-Repeat Markers for Typing of *Brucella spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1982-1993, 2006.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3741-3751, 1997.