

Sílvia Minharro Barbosa

**ISOLAMENTO, TIPIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Brucella abortus*
ISOLADAS DE BOVINOS NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2009

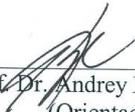
M664i Minharro, Sílvia, 1975-
Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de
bovinos no Brasil / Sílvia Minharro Barbosa.
77 p. : il..

Orientador: Andrey Pereira Lage
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Brucella abortus* – Teses. 3. Brucelose
em bovino – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Univesidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título

CDD – 636.089 692 6

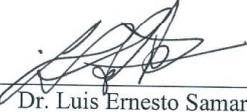
Tese defendida e aprovada em 17 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Andrey Pereira Lage
(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Jane Megid



Dr. Luis Ernesto Samartino



Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann



Prof. Dr. Renato de Lima Santos

À minha inesquecível amiga
Ângela Faloni (*in memórian*) e ao
meu avô Patrício Minharro (*in
memorian*), que incentivaram e
apoiaram o início desta jornada.....
e que de algum lugar participam
do final.....

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao Colegiado da EMVZ/UFT, PROPESQ E PROGRAD por apoiar minha flexibilização para cursar o doutorado e a todos os meus alunos (2005-2007) pela compreensão.

À Fapemig, CNPq, FEP-MVZ pelo apoio financeiro ao projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro individual.

Ao meu orientador, Dr. Andrey Pereira Lage um agradecimento especial pela atenção, estímulo e compreensão das minhas dificuldades pessoais e científicas.

Ao Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, por seu amor, apoio e companheirismo durante toda a fase de execução deste projeto, com suporte emocional e paciência nos meus dias de muita ansiedade e auxílio nas tabelas e nas intermináveis noites de eletroforese.

Ao Dr. Heinrich Neubauer e toda a equipe de trabalho do Fridriech Loeffler Institut, em Jena, Alemanha, pela receptividade e suporte laboratorial e aos Dr^a Mandy Elschner, Dr Falk Melzer, Dr. Gernot Schmoock, pela dedicação e paciência com que me receberam em Jena.

À República “Cinco mulheres e um segredo” (Candoca, Lê, Theo, Patrícia, Jan, O SEGREDO, Hayala, Alyne, D. Milza, Flor, Otto e Penélope) e todos os agregados (Raphael, Tyrone, Lili Pipoca e Natalie), por momentos tão maravilhosos, que ajudaram a superar a distância e sofrimentos, com muito mais facilidade.

À Gissandra Braz pela amizade, confiança e ajuda em todos os momentos da minha estadia em Belo Horizonte.

À Juliana Fonte Boa do Nascimento pelo incentivo, encorajamento, carinho e amizade.

À Família Osório Silva pela hospitalidade e cuidados.

Às amigas Andreza, Bárbara Lafetá, Cíntia e Graziela pelo convívio carinhoso e apoio logístico.

Aos Funcionários da DMVP/EMVZ/UFGM, pela atenção e auxílio na execução do projeto.

A Nádia e Polyana pelo apoio e dicas na minha chegada em Frankfurt-DE.

Ao Prof. Renato de Lima Santos e Alcina Vieira Carvalho Neta pelos conselhos e apoio científico.

Ao Prof. Marcos Bryan Heinemann pela disponibilidade e dedicação.

Ao Prof. Francisco Lobato e Dr. Pedro Mota pela co-orientação.

À Profa. Flávia Tonani e ao Med. Vet. Ademir Campos, pelo apoio e suporte no início desta jornada.

Ao Gláucio, Liu, Vânia, Denise, Paula, Guilherme, Patrícia, Carioca e Guilherme que tornaram minha estadia em Jena uma experiência maravilhosa e inesquecível.

À Rebeca pela amizade, apoio e carinho com que me acolheu na fase final desta jornada.

Em especial a Juliana Mol, Rebeca, Adriano e Elaine pela ajuda imprescindível e dedicação na execução deste projeto.

Aos amigos do LBA/DMVP/EV/UFMG (Ana Cláudia, Ana Paula, Karina, Telma, Fernando Poester, Ana Paula Menici, Cristiane Alves, Juliana, Fernanda, Thiago, Elaine, Rebeca e Giovana) pelo apoio, conselhos, amizade e assistência nos momentos difíceis.

À Bárbara, Roberta e Daniel pelo auxílio nos experimentos iniciais.

Aos professores Maria Auxiliadora Andrade e Guido Fontgalland Coelho Linhares, pelos quais tenho profundo respeito, admiração e reconhecimento pela dedicação com que me transmitiram suas experiências científicas que foram fundamentais na minha formação profissional de pesquisadora.

Aos Veterinários do SIF-TO (Dr. Leógenes, Dr. Marcos Brum, Dr. Marcelo Albuquerque, Dr. Orliomar da Cruz, Dra. Poliana Leonia, Dra. Sany Brito, Dra Françoise de Oliveira, Dr. Werlon Gama, Dra. Adriana Floresta, Dr. Douglas Hass) e do SIF-MG (Dr. Belford Dieguez, Dr. Dermeval S. Neto, Dr. Luiz Rafael Vieira, Dr. Elias Carvalho, Dr. Divino Zandonadi, Dr. Guilherme Correa, Dr. Paulo Sérgio Ribeiro, Dra Elizabeth S. Mango, Dr. Esperaendeus F. Brito, Dr. André Drumond, Dr. Dimas Cardoso, Dr. Néilson Mendes), pela coleta dos materiais nos frigoríficos, fundamental para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
CAPÍTULO 1.....	13
INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO 2.....	15
LITERATURA CONSULTADA.....	15
<i>Brucelose Bovina</i>	15
<i>Importância Econômica</i>	17
<i>Situação da Brucelose Bovina no Brasil e no mundo</i>	18
<i>Diagnóstico</i>	19
<i>Controle e profilaxia</i>	20
<i>Referencias bibliográficas</i>	22
CAPÍTULO 3.....	27
EFICIÊNCIA DO CALDO TRIPTOSE SUPLEMENTADO COM ANTIBIÓTICOS COMO MEIO DE ENRIQUECIMENTO PARA O ISOLAMENTO DE <i>Brucella abortus</i>	27
<i>Resumo</i>	28
<i>Introdução</i>	28
<i>Material e Métodos</i>	29
<i>Resultados</i>	30
<i>Discussão</i>	32
<i>Conclusão</i>	33
<i>Referências Bibliográficas</i>	33
CAPÍTULO 4.....	35
TIPIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM (MLVA16) DE <i>Brucella abortus</i> ISOLADOS DE BOVINOS NO BRASIL.....	35
<i>Resumo</i>	36
<i>Introdução</i>	36
<i>Material e Métodos</i>	37
<i>Resultados</i>	41
<i>Discussão</i>	62
<i>Conclusão</i>	66
<i>Referências Bibliográficas</i>	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Frequência de isolamento de *Brucella abortus* de lesões de ligamento cervical e linfonodos íliaco interno, supra-mamário ou inguinal de bovinos abatidos em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal, no período de outubro de 2006 a novembro de 2007..... 30
- Tabela 2 – Frequência de isolamento de *Brucella abortus* de amostras de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal, no período de outubro de 2006 a novembro de 2007, pelo cultivo direto e após enriquecimento em caldo triptose suplementado com antimicrobianos..... 31
- Tabela 3 - Iniciadores utilizados nos painéis 1 e 2 (2A e 2B) do MLVA 16 (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007) 40
- Tabela 4- Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF) nos Estados do Minas Gerais (MG), Pará (PA), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e Tocantins (TO) entre 1977 e 2008. 43
- Tabela 5 - Genótipos, determinados pelo painel 1 do MLVA¹ (Le Flèche et al., 2006), de *Brucella abortus* isoladas de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF) nos Estados do Minas Gerais (MG), Pará (PA), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e Tocantins (TO), entre 1977 a 2008. 51
- Tabela 6 - Índice de Diversidade (HGDI) calculado para cada *locus* e para os painéis 1, 2A, 2B e MLVA16 segundo os biovariedades de *Brucella abortus* isolados de bovinos no Brasil de 1977 a 2008. 52
- Tabela 7 - Biotipagem, PCR AMOS e genotipagem pelo painel 1 do MLVA 16 das amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil de 1977 a 2008. 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio a 0,5 mg/mL mostrando produtos amplificados nos oito *loci* estudados do Painel 1. M – Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), 1 a 8 amostras de bovinos isoladas no Brasil de 1977 a 2008: 1- 224, 2 - 223, 3 - 34, 4 - 13a/02, 5 - 138, 6 - 163, 7 - 202 e 8 – 477)..... 41
- Figura 2- Padrão de restrição da amplificação do gene *omp 25cd*, pela enzima *Ddel*. 1- Marcador de peso molecular (1Kb plus- Invitrogen), 2- *B. abortus* biovariedade 1 544 , 3- *B. abortus* biovariedade 6 870 , 4- *B. abortus* biovariedade 6 870 , 5- *B. abortus* biovariedade 6 870 6- *B. abortus* biovariedade 3 Tulya, 7- *B. melitensis* biovariedade 1 16M, 8 a 14 isolados de campo de *Brucella abortus* no Brasil de 1977 a 2008.; 8 - amostra 62 (*B. abortus* biovariedade 3), 9 – amostra 66 (*B. abortus* biovariedade 3), 10 – amostra 63 (*B. abortus* biovariedade 3), 11 - amostra J 24 (*B. abortus* biovariedade 6), 12 – amostra SP 3 (*B. abortus* biovariedade 6), 13 – amostra 17 a/02 (*B. abortus* biovariedade 6), 14 – amostra 17b/02 (*B. abortus* biovariedade 6). 45

- Figura 3 - Padrão de restrição da amplificação do gene *omp 2b*, restringido pela enzima *TaqI*. 1- Marcador de peso molecular (1Kbp plus- Invitrogen), 2- *B. abortus* biovariedade 1 544 ATCC 23448^T, 3 - *B. abortus* biovariedade 4 292, 4- *B. abortus* biovariedade 4 292 , 5- isolados de campo de *B. abortus* amostra 16/02..... 45
- Figura 4 – Genótipos das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil definidos pelo painel 1 do MLVA (Le Flèche et al., 2006). Representação gráfica do número de unidades de repetição encontrados para os *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55 do painel 1 do MLVA para cada um dos genótipos encontrados. 49
- Figura 5 – Dendrograma obtido a partir da genótipos pelo MLVA16 das 137 amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos abatidos no Brasil, com as 7 biovariedades de *B. abortus* de referência e as amostras vacinais RB51 e B19. Nas colunas, da esquerda para direita, estão a identificação das amostras, o genótipo obtido pelos painéis 1, 2A, 2B e o MLVA16, os biovars, a origem do animal de onde as amostras foram isoladas e o ano de isolamento. I e II denotam os dois grandes conglomerados encontrados em torno dos genótipos 40 e 28, respectivamente, pelo painel 1 e que apresentam 51,7% de similaridade entre eles..... 54
- Figura 6 - *Minimum spanning tree* (MST) calculado pelo coeficiente categórico e de parcimônia a partir do dendrograma das amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil de 1977 a 2008, juntamente com as 7 amostras de referência de *B. abortus*, e amostras vacinais B19 e RB51 conforme a Fig. 5. a) Identificação do genótipo das amostras conforme o MLVA16. b) Origem dos genótipos conforme os Estados de origem dos animais de onde as amostras foram isoladas, na mesma posição da fig a)..... 57
- Figura 7 – Genótipos das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil definidos pelo painel 2A e 2B do MLVA (Le Flèche et al., 2006, Al Dahouk et al., 2007). Representação gráfica do número de unidades de repetição encontrados para os *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55 do painel 2 do MLVA para cada um dos cinco genótipos mais frequentes encontrados..... 59

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 01- Instruções para coleta, conservação e remessa de material para diagnóstico bacteriológico de brucelose bovina. 72
- ANEXO 2- Características de espécies e biovariedade do gênero *Brucella* sp. 73
- ANEXO 3- Tabela dos resultados do número de repetições de cada *locus* do MLVA16..... 74

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram (i) avaliar a técnica de isolamento de *Brucella* spp. e (ii) biotipar e genotipar amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil, a fim de subsidiar o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PCNEBT). O enriquecimento em caldo triptose suplementado com antimicrobiano de Farrell no isolamento de *Brucella* spp. de material clínico de frigoríficos proporcionou um aumento de 51,36% na taxa de identificação de amostras infectadas em relação ao plaqueamento direto (74/187 versus 36/187), atingindo o maior número de isolados após sete dias de incubação. Dentre 137 isolados de *B. abortus* de bovinos no Brasil entre 1977 a 2008 foram confirmados a presença das biovariedades 1, 2 e 3 e identificadas pela primeira vez as biovariedade 4 e 6. PCR AMOS-ERY classificou as amostras da biovariedade 3 como pertencentes ao subgrupo 3b. Três amostras da biovariedade 3 isoladas no Estado do Pará foram positivas ao PCR-AMOS, podendo indicar um marcador epidemiológico. O Pannel 1 do MLVA16 revelou dois conglomerados (I e II): um agrupando principalmente o genótipo 40 e o outro o genótipo 28. Pannel 2A e 2B do MLVA16 apresentaram alto grau de diversidade nas 137 amostras estudadas, identificando 89 genótipos. A MLVA16 propiciou o conhecimento da distribuição de genótipos e permitirá a construção de um banco de dados para o país.

Palavras-chave: *B. abortus*, diagnóstico, tipificação

ABSTRACT

The aims of the present study were (i) to evaluate isolation methods for *Brucella* spp. and (ii) to biotype and genotype *B. abortus* isolates from cattle in Brazil, in order to support the Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (National Program on the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis) (PCNEBT). Enrichment using tryptose broth supplemented with Farrel antimicrobials increased the isolation rate of *Brucella* spp. 51.36% in clinical material from slaughterhouses (74/187) versus direct plating (36/187). Most of isolates were obtained after 7-day enrichment. From 137 Brazilian *B. abortus* isolates (from 1977 to 2008) biovars 1, 2, and 3 were confirmed and biovars 4 and 6 were identified for the first time. All biovar 3 isolates were classified as subgroup 3b by AMOS-ERY PCR. Three biovar 3 isolates from State of Pará amplified in AMOS PCR and could become an epidemiological marker. MLVA16 panel 1 identified two cluster (I and II): one that mainly clusters around genotype 40 strains and another that clusters around genotype 28. MLVA16 panels 2A and 2B showed high diversity among the 137 studied strains, identifying 89 genotypes. MLVA16 helped knowing the distribution of genotypes and will help to build a Brazilian *B. abortus* genotype database.

Keywords: *B. abortus*, diagnosis, typing

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A pecuária é um dos grandes esteios da economia do Brasil, o qual possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo (IBGE, 2007). Com o estabelecimento da zona livre de febre aftosa com vacinação, nos últimos anos, o mercado internacional para os produtos pecuários brasileiros está se expandindo. No entanto, este mercado requer produtos de qualidade, principalmente sanitária. Os principais requisitos, que vêm se tornando barreiras sanitárias após a erradicação da febre aftosa, são a brucelose e tuberculose.

A brucelose bovina é considerada um problema de saúde animal e pública, distribuída mundialmente, principalmente nos países em desenvolvimento e menor destaque nos países desenvolvidos, em que se encontra em fase avançada de controle e erradicação (Crawford et al., 1990; Young, 1995).

No Brasil, visando melhorar o controle de brucelose e tuberculose no país e a produção de alimentos com melhor qualidade sanitária destinados ao mercado interno e externo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou em 2001 (Brasil, 2001) o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Desde o seu lançamento em 2001, as ações do PNCEBT visam a implantação de um programa de vacinação obrigatória contra brucelose utilizando a vacina B19, a realização de estudos de prevalência de brucelose em vários Estados do país e a formação de recursos humanos para atuar no programa.

A epidemiologia da brucelose é bastante complexa, com vários fatores contribuindo para sua disseminação, principalmente em locais com diferentes sistemas de criação e diferentes práticas criatórias, baixa atenção sanitária, grande movimentação e intenso intercâmbio de animais (Omer et al., 2000). O melhor conhecimento da epidemiologia dessa doença é fundamental para facilitar e acelerar o processo, via a obtenção de áreas e regiões livres de brucelose bovina.

O Regulamento Técnico do PNCEBT (Brasil, 2004) tem como princípio básico para o controle da brucelose bovina, interromper a cadeia de transmissão, detectando precocemente os casos e investigando seus contatos, a fim de prevenir a disseminação da doença no país. O PNCEBT tem como objetivos específicos baixar a prevalência e a incidência de novos casos da doença e criar um número significativo de propriedades livres de brucelose bovina, diminuindo o risco para a saúde pública e oferecendo alimentos de qualidade para a população.

O diagnóstico é fundamental no conhecimento da epidemiologia da enfermidade, permitindo estudar a ocorrência, distribuição e caracterização do agente em questão. O diagnóstico direto da brucelose, especificamente o isolamento e identificação é o método padrão-ouro, que permite a tipificação das espécies de *Brucella* spp. em biovariedades, e que até o presente momento não foi substituído por nenhuma outra técnica de diagnóstico. Porém, como a bacteriologia de *Brucella* spp. é complexa, pelas exigências nutricionais e de atmosfera enriquecida em dióxido de carbono, pelo lento crescimento, e pela necessidade de trabalho em contenção em laboratório de biossegurança de nível 3, os métodos moleculares, vem se destacando no estudo de surtos e identificação da fonte de infecção, bem como na forma de distribuição de *Brucella* spp., e assim contribuindo para tomada de medidas de contenção e prevenção da brucelose.

A brucelose é uma zoonose, sendo os casos humanos originados do contato direto ou indireto com o material de parto ou aborto e produtos de origem animal, portanto o controle e a eliminação da doença é primariamente uma responsabilidade e função do médico veterinário (Nicoletti, 2002). Países como os Estados Unidos da América, que aplicaram medidas de controle como o abate de animais infectados e a vacinação tiveram uma grande diminuição nos casos de brucelose humana (Ragan, 2002).

O presente estudo foi realizado visando apoiar o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Brasil, 2004) e fornecer instrumentos para o diagnóstico e controle da brucelose bovina, pela identificação de padrões de agrupamentos, forma de distribuição e possíveis fontes comuns *B. abortus* no Brasil, por meio da biotipagem e genotipagem das amostras de *Brucella abortus* isoladas em diversas regiões brasileiras e bem como estabelecer relações filogenéticas e biogeográficas possivelmente existentes.

CAPÍTULO 2

LITERATURA CONSULTADA

Brucelose Bovina

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa causada por *Brucella abortus* (*B. abortus*) cujas principais manifestações clínicas são o aborto, retenção de placenta e nascimento de bezerros fracos (Corbel, et al., 2006).

Os microrganismos do gênero *Brucella* são bactérias Gram negativo, extracelulares facultativas. Apresentam-se na forma de cocobacilos ou bastonetes curtos, medindo 0,5-0,7 μm por 0,6-1,5 μm , arranjados isoladamente e raramente formando cadeias curtas. A *B. melitensis* apresenta maior tendência à forma cocóide do que as demais (Bathke, 1999). Não possuem cápsula, são imóveis, e não formam endósporo. Não apresentam coloração bipolar. São aeróbios, alguns necessitam de 5-10 % de CO_2 para crescimento ou isolamento inicial. Crescem bem em temperatura entre 20-40 $^{\circ}\text{C}$, sendo 37 $^{\circ}\text{C}$ a temperatura ideal (OIE, 2008)

Existem sete biovariedades de *B. abortus*, sendo diferenciadas uma das outras por provas bioquímicas como sensibilidade aos corantes tionina e fuccina básica, requerimento de CO_2 , produção de H_2S e presença de antígenos de superfície (A ou M) (Alton et al., 1988).

Apesar das exigências complexas de crescimento *in vitro*, *Brucella* spp. pode resistir em determinados produtos animais e no ambiente por períodos prolongados sob circunstâncias favoráveis como a presença de sombra, umidade alta e baixas temperaturas (Crawford et al., 1990). *B. abortus* pode permanecer nas pastagens por seis meses ou mais, em material de aborto ou parto, portanto, é recomendado deixar os locais com altas taxas de contaminação expostos ao sol, que é um potente germicida. *Brucella* spp. é sensível à pasteurização e aos desinfetantes como

cal, cloro, cresol, fenol e formol, em concentrações ideais, que devem ser utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e ambiente (Russel et al., 1984).

Uma outra classificação de *Brucella* spp. é em relação à morfologia colonial, dividindo-as em dois grupos: lisa e rugosa (Alton et al., 1988). Estas diferenças coloniais refletem diferenças da parede celular de *Brucella* spp., porque a presença ou ausência da cadeia O, componente químico denominado de perosamina e que está localizado na superfície externa de *Brucella* spp., determinam a característica lisa ou rugosa, respectivamente, da colônia (Alton, et al. 1988). Esta informação é muito importante no diagnóstico da doença, em que diversos testes sorológicos usados na rotina foram desenvolvidos com o objetivo detectar anticorpos contra a cadeia O, bem como no controle da doença visto que as amostras rugosas não costumam causar a infecção nos bovinos, sendo muito estudado como candidatas vacinais, facilitando o diagnóstico, por não interferir com as provas de diagnóstico sorológicas de rotina (Paulin e Ferreira Neto, 2003).

Nas amostras lisas o lipopolossacáride (LPS), estrutura da qual a cadeia O faz parte, é composto por três domínios: o lipídeo A, que contém dois tipos de aminoglicosos e ácidos graxos; um núcleo contendo glicose, manose, quinovosamina e o ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico, e em sua extremidade está a cadeia O, composta por um homopolímero com aproximadamente 100 resíduos de 4-formamido-4,6-dideoximanose (perosamina) com ligações predominantemente α -1,2 em amostras com epítomos A dominantes ou ligações α -1,3 a cada cinco resíduos em amostras M dominantes, que são importantes na identificação das espécies e respectivas biovariedades, por testes com soro monoespecíficos anti-A e anti-M, respectivamente (Corbel, 1997).

Em função da alta homologia de DNA e pela análise de hibridização baseada em DNA-DNA, Verger et al. (1985) sugeriram que o

gênero *Brucella* deveria ser considerado uma única espécie, *B. melitensis*. Porém, Allardet-Servent et al. (1988) pelo de estudo do polimorfismo de DNA com enzimas de restrição e trabalhos específicos baseados na sequência de IS711, foram capazes de demonstrar diferenciação entre as espécies, e concordância com a taxonomia clássica utilizada pela maioria dos pesquisadores, da existência de mais de uma espécie e suas biovariedades (Lopez-Goñi, et al., 2008; Bricker e Halling, 1994).

A principal forma de entrada da brucelose em uma propriedade é a introdução de animais infectados (Brasil, 2006a). Dias (2004), pelo estudo de caracterização espacial da brucelose bovina no Estado de São Paulo, observou que a brucelose está associada a rebanhos com grande número de bovinos e que realizam intenso comércio de animais.

Os bovinos são os hospedeiros preferenciais de *B. abortus*, mas outros animais, incluindo bisões, camelos, iaques (Hirsh e Zee, 2003), como também equídeos, suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e cães podem ser infectados (Bathke et al., 1999; Carter e Chengappa, 1991). O bisão e o alce são reservatórios em potencial para a brucelose que poderiam servir como fonte de infecção para os bovinos (McCorquodale e DiGiacomo, 1985).

Outras espécies de *Brucella* como *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar a brucelose nos bovinos quando estes estão em convívio com suínos, cabras e ovinos, que são respectivamente, os reservatórios naturais desses agentes (Acha e Szyfres, 1986; OIE, 2008).

Os cães de fazenda, de um modo geral, não são considerados como os principais reservatórios de *B. abortus*, porém o microrganismo pode ser isolado destes animais na presença de bovinos infectados, devendo ser incluídos no planejamento de erradicação da doença no local (Paulin e Ferreira Neto, 2003). Além disto, podem ser responsáveis por disseminar a doença, por normalmente carregarem produtos de aborto

pelas pastagens e entre as fazendas vizinhas (Vasconcelos et al., 1987).

A transmissão da brucelose bovina se faz principalmente pelo contato direto com fetos abortados, placentas e descargas uterinas infectadas, eliminadas no ambiente em grandes quantidades no momento do parto ou aborto (Enright, 1990). E há um favorecimento da difusão da doença pelo hábito dos bovinos de lambem e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas (Nicoletti, 1980; Silva et al., 2005).

Os animais podem ainda se infectar pelo contato com outras secreções além do material de aborto como leite e descargas vaginais distribuídos no ambiente (Bathke, 1999).

Bezerros nascidos de mães reagentes são, na maioria das vezes, sorologicamente positivos de quatro a seis meses, em decorrência de anticorpos presentes no colostro, mais tarde tornando-se negativos, mesmo que a infecção, em estado latente, esteja presente em uma pequena proporção desses animais (Paulin e Ferreira Neto, 2003).

Bezerras que sofrem a infecção no útero podem permanecer no estado de infecção latente, com o agente persistindo nos pulmões e linfonodos regionais, apresentando-se sorologicamente negativas ou com títulos sorológicos instáveis, até o primeiro parto, soroconvertendo-se a partir da metade de sua primeira gestação, podendo eliminar o agente. Essas infecções latentes nos animais sorologicamente negativos, têm grande importância porque são despercebidas e podem servir como fonte de infecção e nesses casos a vacinação é ineficaz (Brasil, 2006a).

Infecções das glândulas sexuais acessórias de machos permitem disseminação da bactéria por meio do sêmen (Hirsh e Zee, 2003), seja de modo natural ou artificial (Bailey, 1987). A monta natural não tem grande importância para a transmissão da doença, já que o sêmen é depositado na vagina onde existem defesas inespecíficas

que dificultam o processo de infecção. Entretanto, um touro infectado não pode ser utilizado como doador de sêmen na inseminação artificial, pois o sêmen é introduzido diretamente no útero, infectando a fêmea com pequenas quantidades do agente (Brasil, 2006a).

A transferência de embriões, realizada segundo os protocolos internacionalmente preconizados de lavagem e tratamento para a redução da transmissão de agentes infecciosos, não resulta em risco de transmissão de brucelose entre doadoras infectadas e receptoras livre da doença (Brasil, 2006a).

A brucelose também é considerada como uma doença profissional ou ocupacional, acomete fazendeiros, veterinários e açougueiros (Young, 1995). Laboratoristas, por manipularem grandes massas bacterianas na produção de vacinas e antígenos, ou mesmo na rotina de diagnóstico direto, podem infectar-se através de soluções de continuidade da pele ou pelo contato com mucosas, sobretudo a conjuntiva e a mucosa respiratória sendo a inalação uma forma eficiente de infecção (Brasil, 2006a).

As principais fontes de contaminação para o homem são: animais infectados (material contaminado de aborto e restos de placenta) e vacinas vivas atenuadas (casos de acidentes) (Domingues e Langoni, 2001).

A carne crua com restos de tecidos linfáticos e o sangue de animais infectados podem conter microrganismos viáveis, e portanto, de igual modo representam risco para a população consumidora. É importante ressaltar que leite e carne submetidos a tratamento térmico, não trazem risco à saúde pública (Brasil, 2006a).

A transmissão de pessoa a pessoa não é comum e a maioria dos autores a considera insignificante do ponto de vista epidemiológico (Godfroid et al., 2005), porém a importância da enfermidade no ser humano justifica amplamente sua erradicação (Carvalho-Neta et al., 2009).

Importância Econômica

A brucelose está na lista de doença notificáveis da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo considerada como enfermidade transmissível, importante do ponto de vista socioeconômico e sanitário em nível nacional e com significativa repercussão no comércio internacional de animais e de seus produtos (OIE, 2008).

A doença é amplamente disseminada e de grande importância econômica em muitos países do mundo, com perdas relativas ao declínio da produção de leite; aumento do período entre as lactações e conseqüentemente, aumentando o intervalo entre partos, perda de bezerros, onde em rebanhos de gado de corte representam a única fonte de renda para o produtor; eliminação de vacas valiosas e algumas mortes decorrentes de metrite que sobrevém à retenção de placenta (Corbel et al., 2006).

Uma vez instalada a doença no rebanho, além da queda na produção animal, a brucelose faz com que os produtos originados dessa atividade, como o leite e a carne, fiquem vulneráveis às barreiras sanitárias e tarifárias, sofrendo depreciação no mercado internacional (Silva e Itavo, 2002).

Além da desvalorização da pecuária, outro fator causado pela brucelose é a redução progressiva do rebanho pela diminuição da natalidade, em consequência do número de abortos e nascimento de bezerros fracos, queda na produção de leite, aumentando na taxa de reposição de matrizes e descarte por esterilidade (Miranda et al., 2008).

Estimativas mostram que a brucelose é responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e de carne, e redução de 15% na produção de bezerros e que, em cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Bernués et al., 1997).

No Brasil, a estimativa mais recente sobre os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina foi realizada por Homem (2003), que calculou por simulação matemática, um impacto econômico anual de até R\$ 132.676,23, para o município de Pirassununga, Estado de São Paulo.

Lucas (2006) avaliou o impacto econômico da brucelose bovina em Estados do centro-oeste, sudeste e do sul brasileiro, por meio de coleta de dados entre 2001 e 2002, e observou uma média de perdas entre pequenas e médias propriedades um impacto entre 5% a 14% nas propriedades conforme a variação da prevalência da doença na região.

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

A *Brucella* spp. tem sido considerada um agente de risco biológico em potencial em ataques de bioterrorismo, pela severidade da doença e a inexistência de vacina humana (Dunn, 2002; Cuttler, et al., 2005). Como a bactéria é facilmente obtida, pode ser utilizada tanto contra humanos e/ou animais, com maior impacto onde a doença foi erradicada, devendo as autoridades ficarem em estado de alerta nestas localidades (Corbel et al., 2006).

Situação da Brucelose Bovina no Brasil e no mundo

A Brucelose bovina esta distribuída mundialmente, concentrando-se especialmente nos países subdesenvolvidos (Paulin e Ferreira Neto, 2003). Foi erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Canadá, Austrália, Japão e Nova Zelândia (OIE, 2008), porém tem se tornado um problema

re-emergente em muitos países como Israel, Kuwait, Arábia Saudita, Brasil e Colômbia (Corbel, 1997).

No Brasil, a brucelose ocorre endemicamente em todo o território brasileiro (Poester et al., 2002). Os dados oficiais indicam que a prevalência a notificação de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5%, no período de 1988 a 1998 (Brasil, 2006a).

A infecção por *B. abortus* foi diagnosticada em todos os estados da Federação, porém a prevalência difere entre os estados. Inquéritos soroepidemiológicos realizados no período de 2001 a 2004 em 13 unidades federativas (BA, ES, GO, MG, MT, PR, SC, RJ, RS, SP, SE, TO e DF) mostraram que a doença está disseminada em todas as áreas estudadas e que a situação é heterogênea entre Estados e mesmo entre regiões de um mesmo Estado. Evidenciou-se uma tendência de crescimento da prevalência no sentido Centro-Oeste/Norte do país, com prevalências mais elevadas especialmente naqueles estados tradicionais produtores de carne (Brasil, 2006b).

Alguns Estados, como o Mato Grosso, apresentaram aumento da prevalência quando comparado aos dados do último diagnóstico de situação em nível nacional, realizado em 1975 (Anselmo e Pavez, 1977). Confirmou-se a baixa prevalência da doença em Santa Catarina, o que possibilita ao estado implementar estratégias de erradicação da brucelose (Brasil, 2006b). Fato relevante é a diminuição significativa da prevalência da doença em alguns estados como Minas Gerais, estimada em 1,09% com 6,04% de focos, proporcionada pela campanha de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas com vacina B19 iniciada em 1993 (Castro, 1982; Paulin e Ferreira Neto, 2003, Brasil, 2006a).

Apesar da prevalência relativamente baixa de animais infectados por *B. abortus* no Estado de Minas Gerais, a introdução de um programa de erradicação dessas doenças ainda não foi possível pelo elevado número de propriedade com animais infectados, o

que inviabilizaria economicamente um programa baseado no diagnóstico e sacrifício de animais. Desta forma, será necessário ainda o emprego de medidas que diminuam a prevalência antes de se passar a fase de erradicação (Lage, et al. 2008b).

Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose é uma etapa muito importante, pois a correta identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle ou vigilância epidemiológica da brucelose bovina. Este pode ser feito indiretamente, pela detecção de anticorpos contra a *B. abortus* por métodos sorológicos ou pela identificação do agente por meios diretos (bacteriológico, imunohistoquímica, PCR) (Poester et al., 2005)

O número de testes indiretos disponíveis para o diagnóstico de brucelose é amplo. Cada país, segundo suas disponibilidades e suas características, deve escolher aqueles testes que melhor se adaptam a sua estratégia. Em geral, os testes sorológicos são classificados segundo o antígeno utilizado na reação. Nos testes de aglutinação (com antígeno acidificado, lenta, do anel em leite, de Coombs), de fixação de complemento ou imunofluorescência indireta, o antígeno é representado por células inteiras de *B. abortus*. Nos testes de imunodifusão em gel (dupla ou radial), ELISA (indireto e competitivo), hemólise indireta e western blotting, o antígeno é representado pelo lipopolissacarídeo da parede celular da *B. abortus* semipurificado (Brasil, 2006a).

Para Costa (2001), a maioria dos testes sorológicos não apresentam sensibilidade absoluta, devendo-se, normalmente, associar várias técnicas para aumentar o número de animais detectados. Animais recentemente infectados ou com infecção crônica podem não ser detectados por essas técnicas.

Animais recentemente vacinados ou vacinados tardiamente, bem como aqueles infectados com bactérias contendo

antígenos semelhantes aos de *Brucella* spp. (*Yersinia enterocolitica* 09, *Escherichia coli* O157 e O116, *Bordetella bronchiseptica*, *Moraxela* sp.) podem ser detectados pela sorologia. A interpretação dos resultados deve ser feita pela associação do histórico do animal ou propriedade e dos testes laboratoriais (Alton, et al., 1988).

A bacteriologia é considerada o teste padrão-ouro, possui a vantagem da sua alta especificidade e capacidade de identificar diferentes espécies e biovariedades do agente, importante em estudos epidemiologia da doença (Lage et al., 2008b). No entanto, o isolamento de *Brucella* spp. é trabalhoso e, em algumas situações, principalmente em materiais clínicos, apresenta baixa sensibilidade. Além de ser uma bactéria fastidiosa e exigente com relação aos meios de cultivo utilizados no isolamento, há necessidade de manipular material altamente contaminado e infeccioso, sendo necessária instalações e equipamentos de proteção de biossegurança de nível 3 (Poester et al., 2005), além de pessoal bem treinado e qualificado.

Mesmo com estas dificuldades no isolamento da *Brucella* sp., um diagnóstico preciso e procedimentos de tipagem são pontos críticos para o sucesso do controle e erradicação da doença, pois a identificação de espécies é de grande importância epidemiológica (Lopez-Goñi et al., 2008).

A imunohistoquímica tem sido usada como técnica auxiliar em estudos de patogenia e diagnóstico da brucelose por sua versatilidade e praticidade, basta que seja adicionado ao material preparado para histopatologia, um anticorpo específico com um determinado marcador que além de permitir a identificação do agente, permite visualizar as lesões ocasionadas pelo agente (Xavier et al, 2009), possui ainda a vantagem de não necessitar que a bactéria esteja viável nos tecidos, o que permite estudos retrospectivos (Santos et. al., 1998).

Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm se popularizado nos

últimos anos na identificação da *Brucella* spp., especialmente quando usadas a partir de materiais como abortos, sangue e sêmen (Quiapo-Ortuno et al., 1997). A genotipagem é uma técnica que envolve a análise direta do DNA, permitindo grandes avanços na identificação, classificação, diagnóstico e nos estudos de evolução e filogenia de microrganismos (Vergnaud e Pourcel, 2006). Quanto maior o poder discriminatório e melhor reprodutibilidade mais eficiente será a técnica escolhida (Strulens, 1996).

Técnicas derivadas da PCR, como o AMOS-PCR (Bricker e Halling, 1994), AMOS-Enhanced e AMOS-ERY-PCR (Bricker e Halling, 1995; Ocampo-Sosa et al., 2005) PCR-Multiplex (Richtzenhain et al., 2002; López-Goñi et al., 2008) identifica as espécies de *Brucella* spp., têm permitido a identificação de algumas biovariedades e a diferenciação entre as amostras vacinais. Outro avanço é a determinação de genótipos pela técnica da análise de *locus* múltiplos de VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) (MLVA- typing) (Vergnaud e Pourcel, 2006; Le Flèche et al., 2006) que são ferramentas importantes para o conhecimento em detalhado da epidemiologia molecular da doença e podem ser aplicadas em programas de controle e vigilância da brucelose (Le Flèche et al., 2006).

VNTR são sequências repetidas em série, com número variável de repetições (1-10 pb por repetição e 1 a 30 repetições por *locus*). Nelas ocorrem adições ou deleções em cada *locus* provavelmente em decorrência de falhas nas sequências das fitas ou de eventos de *cross-over*, aumentando a frequência de mutações nos *locus*. As variações nos números de repetições aumentam o número de alelos para cada *locus* e ajudam na caracterização individual das amostras. Quando múltiplos *loci* podem ser analisados ao mesmo tempo, o resultado do perfil pode ser altamente discriminatório (Bricker et al., 2003).

Estes resultados são obtidos por análises computacionais, normalmente por avaliação da similaridade genética feita, a qual fornece valores em percentagem da

proximidade genética, estimada pela distância entre os perfis genotípicos. Desta forma a técnica do MLVA-Typing tem sido uma ferramenta útil, robusta e facilmente empregada para análise do VNTR de *Brucella* spp. (Le Flèche, 2006).

Controle e profilaxia

A gravidade da doença, o estado de desenvolvimento da produção animal, a orientação da produção das criações ou as regiões a sanear, assim como as peculiaridades territoriais e os condicionamentos econômicos, são alguns dos fatores que devem ter influência decisiva na eleição dos programas de saneamento e de combate à brucelose (Olsen e Stoffregen, 2005).

O controle da brucelose envolve normalmente quatro partes distintas e importantes: higiene, vacinação massal de fêmeas (entre três e oito meses de idade), diagnóstico e sacrifício dos animais positivos (Bailey, 1987; Brasil, 2004).

Segundo Blood e Radostitis (1991), certas considerações básicas se aplicam a todos os programas que objetivam a erradicação da brucelose:

- Os programas de controle local de determinada área devem receber um reconhecimento fundamental e qualquer plano deve ser adaptado a área em questão;
- A cooperação dos governos local e nacional, em todos os níveis, é absolutamente essencial para o sucesso de um programa. Necessitando de um intenso programa educacional. O proprietário de um rebanho acometido deve conhecer o problema da brucelose e expressar o desejo de colaborar. A experiência revela que o proprietário deve ficar impressionado com os perigos da enfermidade, no que diz respeito à saúde pública, e com as perdas econômicas que podem ocorrer dos animais infectados;

- Um procedimento diagnóstico seguro e uniforme deve ser disponível de forma generalizada;
- Se a doença for revelada em um rebanho, os procedimentos estabelecidos devem ser úteis para manejar a doença. Se a imunização estiver prestes a ser realizada, deve-se dispor prontamente de um agente de imunização padronizada e eficiente. A eliminação de animais infectados pode criar uma séria ameaça econômica para o proprietário e a possibilidade de indenização deve ser explorada;

Finalmente, a movimentação de animais de um lugar para o outro deve ser controlada rigorosamente, uma vez que um programa rígido de erradicação em uma área pode ser anulado por causa de outro que tenha sido negligenciado na vizinhança (Dias, 2004).

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença. Em decorrência desses estudos, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA. Muitas dessas vacinas se mostraram pouco protetoras, como as vacinas mortas, ou ainda estão em fase de testes, como as vacinas de subunidades, recombinantes e de DNA (Schurig et al., 2002; Brasil, 2006a).

Em virtude de *Brucella* spp. serem parasitas extracelular facultativos, as vacinas elaboradas com amostras vivas são mais efetivas, de menor custo e apresentam imunidade mais duradoura que as vacinas inativadas, sendo por isso as mais empregadas na imunização maciça de bovinos e bubalinos. Entre elas, a vacina B19 e, mais recentemente, a RB51 têm sido usadas com maior êxito em programas de controle da brucelose (Schurig et al., 2002; Poester et al., 2006).

A principal contribuição da vacinação no controle da brucelose é que ela protege os

animais sadios que vivem num ambiente contaminado, proporcionando que os doentes sejam eliminados gradativamente (Grasso, 2000). A vacinação diminui o número de abortos num rebanho e aumenta a resistência à infecção, mas não erradica a doença (Costa, 2001; Olsen e Stoffregen, 2005). Apesar da vacinação não levar a erradicação da brucelose por si só, ela é o primeiro passo no início do saneamento de uma propriedade (Olsen e Stoffregen, 2005).

Medidas complementares que visam diminuir a dose de desafio, caso ocorra a exposição, são muito importantes (Brasil, 2004). A exigência de atestado negativo para a brucelose na compra de animais, a aquisição de bezerras que foram vacinadas, a quarentena, o descarte de animais positivos, destruição de fetos abortados, restos placentários, secreções uterinas e desinfecção das instalações são outras medidas de extrema importância para prevenir que a doença se instale ou se propague na propriedade (Viana et al., 1984).

Programas de desinfecção e utilização de piquetes de parição são iniciativas simples que trazem como resultado a diminuição da quantidade de *Brucella* spp. vivas presentes no ambiente. Isso representa diminuir a dose de desafio, o que, por sua vez, significa aumentar os índices de proteção da vacina e diminuir a chance da bactéria infectar um novo animal suscetível (Lage et al., 2008a; Lage et al., 2008b).

Para se ter uma noção da importância da vacinação contra a brucelose, na diminuição da prevalência de bovinos soropositivos, pode-se citar o exemplo do Estado de Minas Gerais, que no ano de 1992, tornou obrigatória a vacinação contra brucelose de bezerras com idade entre 3 a 8 meses, e conseguiu uma diminuição de fêmeas soropositivas para brucelose, de 6,7% em 1980 (Castro, 1982) para 1,09% em 2002 (Brasil, 2006b; Lage et al., 2008a).

Os programas de controle e erradicação da brucelose começaram a ser implantados no ano de 1896, mas foi na década de 1930

que houve um incremento nas suas implantações. A importância do controle e até mesmo da erradicação era justificada pela necessidade da saúde humana e redução de prejuízos econômicos (Grasso, 2000).

No Brasil, em 1944, foi criado o Decreto de Lei n.º 6922 que estabelece a identificação de bovinos vacinados. Outros decretos foram criados sem constituir avanços importantes na prevenção ou no controle da brucelose. Em 1958 foi proposto uma campanha nacional, nos modelos dos EUA, no mesmo ano a resolução 448 trouxe o regulamento de Importação e Exportação de animais (Paulin e Ferreira-Neto, 2002). Em 1965, o Ministério da Agricultura elaborou outro plano de controle baseado na vacinação de bezerras, que não foi colocado em prática (Garcia-Carrillo, 1987). Em 1976, criou-se a Portaria nº 23 contendo medidas regulamentadas para a profilaxia da brucelose animal, prevendo a notificação de focos, a eliminação dos positivos e a vacinação de fêmeas entre três a oito meses de idade, a qual foi revogada posteriormente (Poester et al., 2002; Lage et al., 2005).

Em janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), verificando a ineficácia das medidas até então adotadas, lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT (Brasil, 2004). As principais estratégias do PNCEBT são a adesão voluntária de criadores para a formação de rebanhos livres e monitorados, testes sorológicos regulares em rebanhos de elite para ingresso em exposições e feiras, sacrifício compulsório dos animais positivos, padronização de procedimentos para veterinários habilitados mediante cursos específicos (Brasil, 2004).

Como atividade fundamental para baixar a prevalência da enfermidade, a vacinação compulsória de bezerras com B19 entre 3 e 8 meses de idade em todo o país é considerada crucial para o sucesso do programa. Bezerras vacinadas na idade recomendada, só poderão ser submetidas a

testes sorológicos após completarem 24 meses de idade para evitar a interferência dos anticorpos vacinais (Brasil, 2004). O programa também adotou o uso estratégico de vacinas não aglutinogênicas, RB51, em animais adultos, não vacinados com B19 ou em animais previamente vacinados, em rebanhos com quebra da imunidade, dos quais foram retirados os animais infectados (Brasil, 2007).

Para o bom andamento do PNECBT deve-se levar em consideração que os custos da implantação de um programa no Brasil são elevados, e o conhecimento da epidemiologia da doença é de extrema importância quando se pretende implementar medidas de controle e erradicação, por duas razões principais: 1ª permite escolher as melhores estratégias, pois estas podem diferir dependendo da frequência e do padrão de distribuição da doença e 2ª o conhecimento da situação inicial permitindo acompanhar o andamento do programa e julgar, racionalmente, a necessidade de promover correção, evitando o desperdício de tempo e recursos.

Assim o conhecimento da frequência das doenças, sua forma de distribuição e dos fatores que condicionam sua presença e possibilitam sua difusão, são de extrema importância na elaboração dos programas sanitários (Millen, 2003).

Referencias bibliográficas

ACHA, P., SZYFRES, B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. 2.ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 1986. p. 14-36

ALLARDET-SERVENT, A, BOURG, G., RAMUZ, M., PAGES, M., BELLIS, M., ROIZES, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, v. 170, p.4603 – 4607, 1988.

ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris. 1988, 189 p.

- ANSELMO, F.P., PAVEZ M.M. *Diagnóstico de saúde animal*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735 p.
- BAILEY, J. W. Manual veterinário para criadores de gado. 5 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA, 1987. p. 311-321.
- BATHKE, W. *Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose*. São Paulo: Roca, 1999, .v.2., p.144-160
- BERNUEÉS, A, MANRIQUE, E, MAZA, MT. Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area of Spain. *Prev Vet Med*, v.30, p.137-149, 1997.
- BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 570-579.
- BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6 de 8 de janeiro de 2004. *Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal*. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p. 6 – 10. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 6, de 08 de Janeiro de 2004. *Aprova o regulamento técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – Pncebt*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 Jan. 2004. Seção 1, 6 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. *Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – Pncebt*. Brasília: Mapa/Das/Das, 2006a. 184p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa. *Situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil* (Primeiro Relatório Parcial). Brasília, 2006b. 83p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 33, de 24 de Agosto de 2007. *Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 – Pncebt*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 Ago. 2007. Seção 1, 6p.
- BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* v. 32, 2660– 2666. 1994.
- BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* v. 33, 1640–1642 1995.
- 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 Microbiol.*, v. 3, 2003.
- CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, 4 ed. Philadelphia: London, 1991.p.196-201.
- CARVALHO-NETA A. V., MOL, J. P. S., XAVIER, M. N., PAIXÃO, T.A., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis, *Vet jour.*, 2009 [prelo].
- CASTRO, D. Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo IESA em Minas Gerais-1980. *Bol IESA*. v.1, p.1-12, 1982.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: *International conference on emerging zoonoses, emerging infectious diseases*. Jerusalem: 1997. v. 3, n. 2, p. 213-221.
- CORBEL, M. J., ELBERG, S. S., COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: Who Press, 2006. 89p.

- COSTA, M. Brucelose bovina e eqüina. In: CORREA, F.R, SCHAILD, A.L, MENDEZ,M.D.C. *Doença de ruminantes e eqüinos*. 2.ed. São Paulo. Varela, 2001., v.1, p. 187-197.
- CRAWFORD, R. P., HUBER, J. D., ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p. 131-151, 1990.
- CUTLER, S. J., WHATMORE, A. M., COMMANDER, N. J. Brucellosis- New aspects of an old disease. *J Appl Microbiol*, v. 98, p. 1270-1281, 2005.
- DIAS, R.C. *Caracterização espacial da brucelose bovina no Estado de São Paulo*. 2004. 112 p., São Paulo, Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: publicações biomédicas., 2001, 205 p.
- DUNN, B. R. The Microbiology Laboratorys Role in response to Bioterrorism. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 126, p. 291-294, 2002.
- ENRIGHT, F. M. The pathogenesis and pahobiology of *Brucella* infection of domestic animals. In: NIELSEN K.; DUNCAN J. R. , *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p. 301-320, 1990.
- GARCIA-CARRÍLLO, C. *La brucellosis de los animales en América y su relación com la infección humana*. Paris: Office International des Epizooties, 1987, 299 p.
- GRASSO, L. M. S. *O combate à brucelose bovina*. 2000. 112 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- GODFROID, J., CLOECKAERT, A., LIAUTARD, J.P., KOHLER, S., FRETIN, D., WALRAVENS, K., GARIN-BASTUJI, B., LETESSON, J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v. 36, p. 313-323, 2005.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003 p.191-195.
- HOMEM, V. S. F. *Brucelose e tuberculose bovinas no município de Pirassununga, SP: prevalências, fatores de risco e estudo econômico*. 2003. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- IBGE –Instituto Brasileiro de Giografia e Estatática Sistema IBGE de Recuperação de Dados, Notícias 2007 <http://www.sidra.ibge.gov.br> ,< acesso em 20 de outubro de 2008.>
- LAGE, A.P., POESTE,R F.P., GONÇALVES, V.S.P., ROXO, E., MÜLLER, E.E., CAVALLÉRO, J.C.M., FERREIRA-NETO, J.S., MOTTA, P.M.P.C., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO J.R. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. *Cad. Tec Vet., Zootec*, n.47, p.99-110, 2005.
- LAGE, A. P., GONÇALVES, V. S. P., LOBO, J. R. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal em 2008. *Leite Integral*, v. 3, p. 40-46, 2008a.
- LAGE, A. P., POESTER, F. P., PAIXÃO, T. A., SILVA T. A., XAVIER. M. N., MINHARRO, S., MIRANDA, K. L., ALVES, C. M., MOL, J. P. S., SANTOS, L. R., Brucelose bovina: uma atualização. *Res Bras Reprod Anim.*, v. 32, p. 202-212, 2008b.

- LE FLECHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON P., DENOEUDE, F., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A., VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat *Loci* for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, v. 6, n. 9, 2006.
- LOPEZ-GOÑI, I., YOLDI-GARCIA, D., MARÍN, C.M., MIGUEL M. J., MUNÓZ, P. M., BLASCO, J. M., JACQUES, I., GRAYON, M., CLOECKAERT, A., FERREIRA, A. C., CARDOSO, R., CORRÊA DE SÁ, M. I., WALRAVENS, K., ALBERT, D., GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a Multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccina strains. *J Clin Microbiol*, v. 26, n.10, p. 3484-3487, 2008.
- LUCAS, A. Simulação de impacto-econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões centro-oeste, sudeste e sul do país. 2006, 124 p., Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MCCORQUODALE, S. M., DIGIACOMO, R. F. The role of wild american ungulates in the epidemiology of bovine brucellosis: a review. *J wildl dis.*, v. 21, n. 4, p 351-357, 1985.
- MILLEN, E. *Guia Técnico Agropecuário: veterinária e zootecnia*. São Paulo:Instituto Brasileiro de Ensino Agrícola, 2003. p. 471-474
- MIRANDA, K. L. ; ALVES, C. M. ; MINHARRO, S. ; LOBO, J. R. ; MULLER, E. E. ; GONCALVES, V. S. P. ; LAGE, A. P. . Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT. *Leite integral*, Belo Horizonte-MG, out-nov, p. 44 – 55, 2008.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med.*, v.24, p. 69-98., 1980.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p.191-195, 2002.
- OCAMPO-SOSA, A. A., AGÜERO-BALBÍN, J., GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol* , v. 110, p. 41–51, 2005.
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008, p. 328 – 345.
- OLSEN, S. C., STOFFREGEN, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert. Rev. Vaccines*, v. 4, n. 6, p. 915-928, 2005.
- OMER, M.K., SKJERVE, E., WOLDEHIWET, Z., HOLSTAD, G. Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, v. 46, n. 4, p. 257-265, 2000.
- PAULIN, L. M; FERREIRA NETO, J. S. A Experiência brasileira no combate à brucelose bovina. *Arq Inst Biol*. São Paulo, v. 68, n. 2, p.105-112, 2002.
- PAULIN L. M., FERREIRA-NETO J. S. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. Jaboticabal: Editora Funep, 2003. 154p
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S. P., LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*. v. 90, p.55-62, 2002.
- POESTER, F. P., SAMARTINO, L. E. LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. *Cad Téc Vet Zootec*, n.47, p.13-29, 2005.
- POESTER, F. P., GONÇALVES, V. S. P., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. OLSEN, S. C., SCHURING, G. G., Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v. 24, p. 5327-5334, 2006.
- QUEIPO-OTURNO, M. I., MORATA, P., OCÓN, P., MANCHADO, P., COLMENERO, J. D. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *J. Clin Microbiol*. v.35, n.11, p. 2927-2930, 1997.

- RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p.11-18, 2002.
- 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. *Vet Microbiol.* v. 87, p. 139-147, 2002.
- RUSSEL, A.D.; KOULIKOVSKII, A.V. *Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases*. Geneva: WHO, 61 p., 1984.
- SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDES, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detecção de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidinabiotina- peroxidasa em el testículo y em el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch de Reprod Anim.*, n. 6, p. 34-41, 1998.
- SANTOS, R.L., SILVA, F.L., PAIXÃO, T.A., SAMARTINO, L.E., Brucelose: Zoonose e Bioterrorismo. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p. 83-98, 2005.
- SILVA, F. F; ÍTAVO, L. C. V. Consumo, desempenho, características de carcaça e biometria do trato gastrointestinal e dos órgãos internos de novilhos Nelores recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado e proteína. *Rev Bras Zoot*, v. 31, n. 4, p. 1654-1670, 2002.
- SILVA, F.L., PAIXÃO, T.A., BORGES, A.M., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Brucelose Bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p. 1-12, 2005.
- SCHURIG, G.G., SRIRANGANATHAN N., CORBEL M.J., Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.*, v. 90, p. 479-496, 2002.
- STRULENS, M. J., Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* , v. 2, p. 2-11, 1996.
- VASCONCELLOS, S. A., ITO, F. H., CÔRTEZ, J. A. *Bases para a prevenção da brucelose animal*. Comunicações científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v. 11, n. 1, p. 25-36, 1987.
- VERGER, J. M., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, GRAYON, M., *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 35, p. 292-295, 1985.
- VERGNAUD, G., POURCEL, C. *Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis (MLVA). Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Stackebrandt: Springer-Verlag, 2006, p. 83-104.
- VIANA, F. D.; SILVA, J. A., TORRES, A. M. C. Brucelose, uma alternativa de controle. *Raízes*. São Paulo: Gessulli. Ano IX, n. 102, p. 9-13, 1984.
- XAVIER, M. N., PAIXÃO, T. A., POESTER, F. P., LAGE, A. P., SANTOS, R. L., Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. *J comp pathol.*, v. 140, p. 149-157, 2009.
- YOUNG, E.J. An Overview of Human Brucellosis. *Clin Infec Dis.*, v.21, p.283-290, 1995.

CAPÍTULO 3

EFICIÊNCIA DO CALDO TRIPTOSE SUPLEMENTADO COM ANTIBIÓTICOS COMO
MEIO DE ENRIQUECIMENTO PARA O ISOLAMENTO DE *Brucella abortus*.

Resumo

O isolamento e identificação de *Brucella* sp. tem sido considerado o método padrão-ouro para o diagnóstico da brucelose. No entanto, a técnica de isolamento e identificação possui algumas dificuldades, em função da *Brucella* sp. ser uma bactéria exigente e fastidiosa para o crescimento e também pela sensibilidade da técnica depender da viabilidade e do número de *Brucella* sp. na amostra e da própria natureza da amostra clínica. Uma alternativa eficiente para se suplantarem estes inconvenientes é a utilização de meios de enriquecimento antes do plaqueamento direto. Desta forma o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do caldo triptose suplementado com antimicrobianos de Farrell como forma de enriquecimento no isolamento de *B. abortus*. Foram testadas 187 amostras de bovinos suspeitos de infecção por *B. abortus*. A partir de linfonodos ilíaco interno, linfonodos supramamário e lesões do ligamento cervical destes animais abatidos foram isoladas e identificadas 74 (39,57%) amostras de *B. abortus*. O plaqueamento direto em ágar triptose suplementado possibilitou o isolamento de 36 (48,64%) das 74 amostras detectadas. Todas as amostras (100%) cresceram após enriquecimento em caldo triptose suplementado com meio de Farrell por 7 a 14 dias de incubação. A metodologia de enriquecimento utilizada proporcionou um aumento significativo na taxa de identificação de amostras clínicas infectadas da ordem de 51,36% (38 amostras) demonstrando ser eficiente como meio de enriquecimento para o isolamento e identificação de *B. abortus*.

Introdução

O diagnóstico direto da brucelose pode ser realizado por exames bacteriológicos, imunoistoquímica ou pela reação em cadeia da polimerase (Alton et al., 1988; Santos et al., 1998; Al Dahouk et al., 2003; Xavier et al., 2009). Dentre estes, o isolamento e identificação de *Brucella* spp. é considerado como padrão-ouro para o diagnóstico da

brucelose, sendo importante tanto no diagnóstico da enfermidade, como na epidemiologia da doença, por permitir a tipificação das amostras isoladas, o modo de distribuição em um rebanho ou uma região e a origem de focos de infecção (Bricker, 2002; Al Dahouk et al., 2003; Le Flèche et al., 2006). No entanto, a técnica de isolamento e identificação possui algumas dificuldades em função de *Brucella* spp. serem bactérias exigentes e fastidiosas para o crescimento, requerendo no isolamento primário meios de cultivo ricos em nutrientes (Alton et al., 1988). Além disso, a sensibilidade da técnica depende da viabilidade e do número de *Brucella* spp. na amostra e da própria natureza da amostra clínica (Refai, 2003).

A eficiência do crescimento bacteriano no isolamento primário depende também de variações na composição do meio de cultivo e do tempo de manutenção das amostras no congelamento, que pode ocasionar injúrias e danos à bactéria diminuindo a eficiência da técnica, bem como da natureza da infecção (Alton et al., 1988; OIE, 2008; Waltman, 2000). Outro ponto importante no isolamento é a necessidade do uso de meios ricos suplementados com antibióticos, em função da presença de bactérias secundárias contaminantes que inibem o crescimento de *Brucella* spp., seja por competirem por nutrientes ou pela produção de substâncias tóxicas, ou ainda por mascarar as colônias de *Brucella* sp. entre as contaminantes (Farrell, 1974).

Por isso, como forma de melhorar a sensibilidade do isolamento, é indicado o uso de meio de cultivo suplementado com antibióticos para o processamento, principalmente, de amostras de tecidos que não sejam provenientes de material de aborto, em função do pequeno número de bactérias viáveis neste tipo de amostra clínica (Alton et al., 1988; OIE, 2008). Uma alternativa eficiente para suplantarem o inconveniente do reduzido número de bactérias em amostras clínicas diferentes de aborto é a utilização de meios de enriquecimento (caldos suplementados com antimicrobianos ou não), permitindo às

Brucella spp. melhores condições de multiplicação e crescimento e, conseqüentemente, elevando o número de células bacterianas detectáveis no plaqueamento (Alton et al. 1988; Waltman, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do caldo triptose suplementado com antimicrobianos de Farrell como forma de enriquecimento seletivo no isolamento primário de *B. abortus*.

Material e Métodos

Foram coletadas 187 amostras, compostas por dois tipos de materiais clínicos: linfonodos íliaco interno, supramamário ou inguinal e lesões do ligamento cervical de bovinos abatidos nos Estados de Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul e Tocantins, no período de outubro de 2006 a novembro de 2007. Os linfonodos foram coletados de animais sorologicamente positivos para brucelose encaminhados aos frigoríficos para sacrifício e as amostras de lesões de ligamentos cervicais foram coletadas quando as carcaças apresentavam lesões sugestivas de brucelose nas linhas de inspeção sob supervisão do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram coletadas 103 amostras de linfonodos íliacos internos, supra-mamários ou inguinais (96 amostras de Minas Gerais e 7 amostras do Rio Grande do Sul) e 84 amostras de lesões de ligamentos cervicais (33 amostras do Tocantins e 51 do Pará). O material coletado foi acondicionado em recipiente plástico, identificado, congelado e encaminhado ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foi acondicionados a -20°C até o seu processamento.

Antes do processamento, as amostras sofreram descongelamento lento entre 5°C e 10°C, por 18 a 24h. Após o descongelamento, os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos e colocados em sacos plásticos estéreis,

adicionado de PBS pH7,2 estéril, em um volume aproximado ao dobro do volume de tecido, e macerados com auxílio de homogenizador de amostras (Modelo MC 1204, ITR, Brasil), por aproximadamente 5 minutos. De cada material macerado foram inoculados 100 µL em duplicatas de placas de Petri contendo ágar triptose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (*Brucella* Selective Supplement SR0083A, Oxoid, UK) (Farrell, 1974). Em paralelo, 100 µL do produto da maceração foram inoculados em tubos com 10 mL de caldo triptose contendo suplemento antimicrobiano de Farrell, que foram incubados em 5% de CO₂ a 37°C junto com as placas. Repiques foram realizados, em duplicata, a partir do caldo nos dias 7, 14 e 21, com auxílio de suabes estéreis, para placas de ágar triptose suplementadas. Todas as placas foram incubadas em 5% de CO₂, a 37°C, por, no mínimo, 21 dias, antes de serem descartadas como negativas.

A identificação das colônias com morfologia sugestiva de *Brucella* spp. foi realizada pelos testes de catalase, oxidase, urease, citrato e redução de nitrato (Mac Faddin, 1980; Alton et al., 1988). As amostras isoladas também foram submetidas às técnicas de PCR para identificação de *Brucella* spp. (Baily et al, 1992) e multiplex PCR- AMOS, o qual é capaz de identificar e diferenciar entre as espécies de *B. abortus* biovariedade 1, 2 e 4; *B. melitensis*; *B. ovis* e *B. suis* biovariedade 1 (Bricker e Halling, 1994).

As colônias de *Brucella* spp. foram suspendidas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) inativadas a 85°C por 2 horas e submetidas à extração do DNA genômico segundo Pitcher et al. (1989). A verificação da pureza e determinação da concentração de DNA foi realizada espectrofotometricamente (Sambrook e Russel, 2001) e padronizada para ser utilizado 4 ng/µL na concentração final nas reações. A visualização dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose (Invitrogen; Carlsbad, CA,USA)

a 1,0% corado com brometo de etídeo a 0,5 mg/mL (Sigma, St. Louis, IL, EUA).

Como controle dos procedimentos realizados foram utilizadas as amostras de referência *B. abortus* biovariedade 1 544 ATCC 23448, *B. melitensis* biovariedade 1 16M ATCC 23456^T, *B. ovis* Reo 198, *B. suis* biovariedade 1 1330 ATCC 23444, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* B41, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Para avaliar a eficiência do uso do enriquecimento em caldo triptose suplementado com antimicrobianos, as diferenças entre os tempos de incubação e as frequências de isolamento unicamente após o enriquecimento utilizaram-se os testes de Fisher, de qui-quadrado (Sampaio, 2002), binominal, de McNemar (Siegel, 1975) e de kappa (Smith, 1995) mediante a aplicação dos pacotes estatísticos Epistat

(Gustafson, T.L.; Round Rock, Texas, USA), Minitab 14.1 (Minitab Inc., USA) e WinEpiscope 2.0 (Thrusfield et al., 2001). Em todas as análises foi empregado um erro α de 0,05 (Sampaio, 2002).

Resultados

Dos 187 materiais clínicos provenientes dos linfonodos íliaco interno, supramamário ou inguinal e de lesões de ligamento cervical de animais abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal, foram isoladas 74 (39,57%) amostras de *Brucella* spp. Todas as amostras isoladas amplificaram o gene *bcbp31* (Baily et al., 1992) e foram identificadas como *B. abortus* pelos testes bioquímicos. À técnica PCR-AMOS (Bricker e Halling, 1994), todas as amostras apresentaram dois fragmentos amplificados: 408 bp, relativo ao fragmento específico de *B. abortu* e 178 bp, relativo à amplificação do gene *eri*. Dessas amostras, 22,46% foram isoladas de lesões de ligamento cervical e 17,11% de linfonodos de animais sorologicamente positivos (Tab. 1).

Tabela 1- Frequência de isolamento de *Brucella abortus* de lesões de ligamento cervical e linfonodos íliaco interno, supra-mamário ou inguinal de bovinos abatidos em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal, no período de outubro de 2006 a novembro de 2007.

Amostra Clínica	Isolados		Total de amostras processadas	
	N ²	%	N	%
Ligamento Cervical	42 ³	50,0	84	44,9
Linfonodos ¹	32	31,1	103	55,1
Total	74	39,7	187	100

1 – Linfonodos íliaco interno, supramamário ou inguinal
 2 – Isolados – número de amostras de *B. abortus* isoladas
 3 – $\chi^2=6,93$; GL = 1; P=0,009

Do total de 74 amostras isoladas, 100% cresceram após enriquecimento em caldo triptose suplementado com antimicrobiano de Farrell, com período de enriquecimento variando entre 7 e 14 dias de incubação antes da inoculação em placas com ágar triptose suplementado. Nenhum isolado

adicional de *B. abortus* foi obtido com enriquecimento por 21 dias (Tab. 2).

O plaqueamento direto em ágar triptose suplementado possibilitou o isolamento de 36 (48,64%) do total de 74 amostras isoladas. De todas as amostras clínicas em

que se isolou *B. abortus* pelo plaqueamento direto também foi possível o isolamento após enriquecimento. Desta forma, a metodologia de enriquecimento utilizada proporcionou um aumento na taxa de identificação de amostras clínicas infectadas da ordem de 51,36% (38 amostras) (Tab. 2). Essa diferença na frequência de isolamento de *B. abortus* entre as duas técnicas mostrou-se significativa ao teste de McNemar ($\chi^2 = 36,02$, $P < 0,0001$), que também foi reforçada pela baixa concordância observada pelo teste de kappa ($\kappa = 0,534$).

Relativamente ao tempo de crescimento das colônias, foi verificado que no plaqueamento direto, as colônias foram observadas normalmente com 72 horas de incubação.

Já depois do enriquecimento em caldo, as colônias foram observadas nas placas 48 horas após a semeadura.

Houve uma maior frequência de isolamento de *B. abortus* a partir de lesões de bursite cervical (50%) em comparação com os isolamentos de linfonodos (31%) ($\chi^2 = 6,93$; $GL = 1$; $P = 0,009$) (Tab. 1). O efeito do enriquecimento também foi maior nesse material clínico (Tab. 2), pois a frequência de amostras de *B. abortus* que foram isoladas de lesões de ligamento cervical unicamente após enriquecimento em caldo triptose suplementado com antibióticos (62%) é significativamente maior que aquelas isoladas de linfonodos unicamente após enriquecimento (37,5%) ($\chi^2 = 4,43$; $GL = 1$; $P = 0,037$).

Tabela 2 – Frequência de isolamento de *Brucella abortus* de amostras de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal, no período de outubro de 2006 a novembro de 2007, pelo cultivo direto e após enriquecimento em caldo triptose suplementado com antimicrobianos.

Amostra Clínica	Enriquecimento em Caldo ¹ (dias)				Cultivo Direto ³	Total ⁴
	7	14	21	T ²		
Ligamento Cervical	22	4	0	26	16	42
Linfonodos ⁵	5	7	0	12	20	32
Total	27	11	0	38	36	74

1 – Amostras isoladas após 7, 14 e 21 dias de enriquecimento em caldo triptose suplementado com antibióticos de Farrell (1974). Todas as amostras isoladas de material clínico pelo cultivo direto também foram isoladas após 7 dias de enriquecimento em caldo, mas aqui só são mostradas as amostras que foram isoladas unicamente após o enriquecimento;

2 – Total de amostras que só foram isoladas após enriquecimento;

3 – Todas amostras isoladas pelo cultivo direto também foram detectadas após enriquecimento em caldo.

4 – Somatório do total de amostras isoladas somente após o enriquecimento e daquelas isoladas no cultivo direto.

5 – Linfonodos ilíaco interno, supramamário e inguinal

No que concerne ao tempo de incubação no caldo triptose, houve maior frequência de isolamento com 7 dias (27/38; 71,05%; $P = 0,014$) que com 14 dias de enriquecimento em caldo triptose. Esta diferença foi decorrente da frequência de isolamento de *B. abortus* do material de ligamento cervical com 7 dias (84,6%) de incubação que foi significativamente

superior ao com 14 dias de incubação ($P = 0,001$). Para as amostras de linfonodos não houve diferença significativa do número de isolados com 7 dias (41,67%) e com 14 dias de enriquecimento. Não houve acréscimo no número de amostras clínicas infectadas por *B. abortus* pela incubação do caldo triptose por 21 dias (Tab. 2).

Um dos constantes problemas durante o processamento das amostras foi a contaminação no processamento dos linfonodos quando realizado o plaqueamento direto ou quando utilizado o caldo, mesmo suplementados.

Discussão

O enriquecimento em caldo triptose suplementado com os antimicrobianos de Farrell (Farrell, 1974) foi capaz de aumentar o isolamento de *B. abortus* de amostras clínicas de bovinos coletadas em frigoríficos em mais de 50%, mostrando-se altamente sensível, o que evidencia um aumento na eficiência analítica da técnica de isolamento.

Esse aumento da eficiência analítica da técnica do enriquecimento pode ser decorrente da utilização de material clínico congelado para o isolamento. O congelamento das amostras se faz necessário, pois na rotina não é possível que as amostras coletadas em frigoríficos cheguem em curto espaço de tempo aos laboratórios especializados capacitados para o isolamento de *B. abortus*. Apesar de Alton et al., (1988) afirmarem que não há redução no número de *B. abortus* viáveis em amostras infectadas quando conservadas por até dezoito meses congeladas a -20°C , contudo o congelamento pode se constituir em uma situação adversa, estressando as bactérias e reduzindo a sua viabilidade (Waltman, 2000).

A utilização do meio de enriquecimento, por fornecer nutrientes necessários e suficientes para o restabelecimento das células bacterianas danificadas e tempo para estas bactérias se recuperarem pode facilitar o isolamento de microrganismos fastidiosos como *B. abortus* (Waltman, 2000).

Uma alternativa citada na literatura para se aumentar a sensibilidade do isolamento de *B. abortus* de material clínico (Herr e Roux, 1981) é a concentração do material por centrifugação do sobrenadante no início do processamento da amostra, logo após a utilização do homogeneizador. O enriquecimento aqui proposto se mostrou

altamente eficaz no aumento da taxa de recuperação de *B. abortus* de animais infectados sem o inconveniente do aumento do risco de contaminação dos laboratoristas pelos aerossóis que podem ser gerados nas etapas de centrifugação. Este risco não pode ser negligenciado, pois *Brucella* spp. é uma das principais causas de infecção laboratorial (Fiori et al., 2000; Yagupsky e Baron, 2005).

As lesões de ligamento cervical utilizadas neste estudo foram originárias de bovinos dos Estados do Pará e Tocantins, distantes mais de 2000 km do laboratório de processamento das mesmas. As variações de temperatura decorrentes do descongelamento parcial que pode ter ocorrido durante o transporte do frigorífico ao laboratório em função das longas distâncias entre eles e do tempo gasto neste transporte e do recongelamento até o processamento podem também ter contribuído para aumentar as situações estressantes para as bactérias, reduzindo a viabilidade das mesmas no material congelado, pois esse tipo de material clínico possui alta concentração de *B. abortus* (Corbel et al., 2006; OIE, 2008). Desta forma, o efeito do enriquecimento no isolamento de *B. abortus* foi significativamente mais marcante nas lesões de ligamento cervical que nos linfonodos, que foram coletados em sua maioria no Estado de Minas Gerais onde foram processados.

A alta frequência de isolamento de *B. abortus* de lesões de ligamento cervical provavelmente decorre das lesões de ligamento cervical serem sugestivas de infecção por *B. abortus* e a coleta deste material no frigorífico é realizada com grande assepsia e cuidados para que não haja perfuração na bolsa serosa, que se forma com a bursite, com consequente extravasamento de líquidos e contaminação da carcaça e do ambiente. Deste modo, esses materiais estão menos sujeitos à contaminações secundárias. Outra justificativa para este resultado é o grande número de *B. abortus* presentes em lesões de bursite cervical (Corbel et al., 2006; OIE, 2008).

O mesmo não ocorreu com a coleta dos linfonodos, que além de possuírem menor número de bactérias (Corbel et al., 2006; OIE, 2008), muitas vezes são abertos no ato da inspeção, para visualização interna do órgão, o que aumenta a superfície de contato com utensílios, como facas e ganchos, e o ambiente, expondo o material à flora ambiental contaminante. Isso pode ter influenciado na menor taxa de isolamento de *B. abortus* de linfonodos, pois a contaminação sempre foi maior neste tipo de material, sendo este fator o maior impedimento para o isolamento de *B. abortus*, mesmo quando utilizado o meio de Farrell (Alton et al., 1988; Ewalt, 1989). Estes achados mais uma vez reforçam a recomendação de que os linfonodos sejam enviados fechados ao laboratório para tentativa de isolamento (Alton et al., 1988).

O enriquecimento por até 14 dias propiciou o máximo de amostras de *B. abortus* isoladas do material clínico estudado. Provavelmente a ausência de isolamento de novas amostras de *B. abortus* após 21 dias de incubação do meio de enriquecimento deveu-se à exaustão dos nutrientes do meio. No entanto, a incubação por 7 dias do caldo triptose suplementado possibilitou a detecção de mais de 70% das amostras unicamente isoladas após o enriquecimento (Tab. 2), indicando ser este o período de incubação que produziu o efeito mais marcante na taxa de isolamento de *B. abortus*.

Conclusão

A utilização do caldo triptose suplementado com os antimicrobianos de Farrell como meio de enriquecimento para o isolamento de *B. abortus*, que é de fácil implantação e manutenção na rotina laboratorial, foi altamente sensível e eficaz no diagnóstico, aumentando em mais de 50 % a eficiência analítica da técnica, obtendo o máximo de isolados após 7 dias incubação, e mostrando-se essencial na correta identificação de animais infectados..

Referências Bibliográficas

AL DAHOUK, S., TOMASO, H, NÖCKLER, K, NEUBAUER, H, FRANGOULIS, D. Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis – A Review of Literature. Part I ,Techniques for Direct Detection and Identification of *Brucella sp.*, *Clin. Lab.* v .49, p.487-505, 2003.

ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris. 1988, 189 p.

BAILY, G. G., KRAHN, J. B., DRASAR, B. S., STOCKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg.* v. 95, p.271-275, 1992.

BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* v. 32, p. 2660– 2666, 1994.

BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet. Microb.* v. 90, p. 433-434, 2002.

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

EWALT, D.R. Comparison of three culture techniques for the isolation of *Brucella abortus* from bovine supramammary lymphonodes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.1, p.227-230, 1989.

FARRELL, I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.*, v.16, p.280-286, 1974.

FIORI, P. L., MASTRANDREA, S., RAPPELLI, P., et al. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n.5, p. 2005-2006, 2000.

- HERR S, ROUX, D. The efficacy of bacteriological procedures for the isolation of *Brucella abortus* from abattoir material. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 48 p. 7-12, 1981.
- LE FLECHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON P., DENOEUDE, F., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A., VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat *Loci* for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, v. 6, n. 9, 2006.
- Mac FADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301 p
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008, p. 328 - 345
- PITCHER, D. G., N. A. SAUNDERS, AND R. J. OWEN., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* v.8, p.151–156, 1989.
- REFAI, M. Application of biotechnology in the diagnosis and control of brucellosis in the Near East Region. *World J. of Microb & Biotec.* v. 19 p. 443-449, 2003.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 Ed. Plymouth: CSHL Press, 2001. 2344 p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada á experimentação animal*. Fundação de Estudo e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 264 p.
- SANTOS, R.L. PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDS, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detecção de *Brucella abortus* (amuestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidina – biotina – peroxidasa em testículo y en epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch. Reprod. Ani.*, v. 6, p. 34 – 41, 1998.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica: para as ciências do comportamento*. SãoPaulo, Mc Graw-Hill do Brasil, 1975. 350 p.
- SMITH, R. D. *Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach*. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 279p.
- THRUSFIELD, M., ORTEGA, C., DE BLAS, I., NOORDHUIZEN, J.P., FRANKENA, K. Win Episcopy 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*, v. 148, n.18, p. 567-572, 2001.
- WALTMAN, W. D. Methods for the cultural isolation for *Salmonella*. In: WRAY & WRAY. *Salmonella in Domestic Animals*. USA, New York, 2000, p. 355-372
- XAVIER, M.N., PAIXÃO, T.A., POESTER, F.P., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol.*, v. 140, p. 149-157, 2009.
- YAGUPSKY, P., BARON, E. J. Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis*, v.11, n. 8, p. 1180-1185. 2005.

CAPÍTULO 4

TIPIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM (MLVA16) DE *Brucella abortus* ISOLADOS DE
BOVINOS NO BRASIL

Resumo

A brucelose é uma zoonose bacteriana distribuída mundialmente, responsável por perdas econômicas significativas decorrentes de abortos e sacrifício de animais infectados. No Brasil existem poucos estudos realizados com relação à identificação das biovariedades de *Brucella* spp. presentes. Como a identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle e erradicação da brucelose bovina, o objetivo deste trabalho foi biotipar e genotipar, amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil, identificar possíveis padrões de agrupamentos e a distribuição das biovariedades e genótipos de *B. abortus* fornecendo subsídios ao Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PCNEBT). Foram utilizados 137 amostras de *B. abortus*, isoladas de bovinos no Brasil de 1977 a 2008. A tipagem das amostras confirmou a presença das biovariedades 1, 2 e 3 de *B. abortus* e revelou a presença de *B. abortus* biovariedade 4 e *B. abortus* biovariedade 6, pelas provas bioquímicas. O AMOS-ERY-PCR classificou as amostras biovariedade 3 como pertencentes ao sub-grupo 3b. Três amostras de *B. abortus* biovariedade 3 isoladas no Estado do Pará foram positivas no PCR-AMOS, podendo ser indicativo de um marcador epidemiológico para aquela localidade. A análise dos agrupamentos pelo dendograma das amostras genotipadas revelou dois conglomerados (I e II), onde o primeiro agrupou principalmente, pelo painel 1, o genótipo 40 e o segundo o genótipo 28. O Painel 2A e 2B do MLVA16 apresentou um alto grau de diversidade, sendo eficiente na distinção das amostras estudadas além de auxiliar na identificação da forma de distribuição de alguns genótipos. Pelo MLVA16 foram classificados 89 genótipos, sendo significativo para a construção de um banco de dados do País.

Introdução

A brucelose é uma zoonose bacteriana distribuída mundialmente, responsável por

perdas econômicas significativas decorrentes de abortos e sacrifício de animais infectados (Corbel et al., 2006). O gênero *Brucella* possui atualmente nove espécies morfológicamente indistintas, associadas preferencialmente a diferentes hospedeiros: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (canídeos), *B. ceti* (cetáceos), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. microti* (*Microtus arvalis*), *B. neotomae* (*Neotoma lepida*), *B. ovis* (ovinos), *B. pinipedialis* (pinipenídeos) e *B. suis* (suídeos) (Osterman e Moriyón, 2006; Foster et al., 2007; Scholz et al., 2008).

A brucelose bovina é causada principalmente pela *B. abortus* e suas principais manifestações clínicas são aborto no terço final da gestação, retenção de placenta e nascimento de bezerras fracas (Silva et al., 2005; Corbel et al., 2006). *B. suis* e *B. melitensis* também podem infectar bovinos quando estes convivem com suínos e com caprinos e ovinos, respectivamente (Corbel et al., 2006; OIE, 2008).

A correta identificação de animais infectados é uma das bases de um programa de controle e erradicação da brucelose bovina (Lage et al., 2005; Poester et al., 2005). O diagnóstico direto da brucelose pode ser realizado por exames bacteriológicos, imunoistoquímica ou pela reação em cadeia da polimerase (Alton et al., 1988; Santos et al., 1998; Al Dahouk et al., 2003). A bacteriologia é considerada o teste padrão ouro no diagnóstico da brucelose, possui a vantagem da sua alta especificidade e por identificar diferentes espécies e biovariedades do agente é de grande importância na epidemiologia da doença, possibilitando estudar a forma de distribuição em uma região ou uma possível origem de focos de infecção (Bricker, 2002; Poester et al., 2002; Al Dahouk et al., 2003; Lucero et al., 2008).

No Brasil existem poucos estudos realizados com relação à identificação das biovariedades de *Brucella* spp., porém já foram identificadas *B. abortus* biovariedade 1, 2 e 3 e *B. suis* biovariedade 1 (Garcia-

Carrilo, 1972; Giorgi, et al., 1972; Langenegger et al., 1975; Megid, et al., 2005). Além dessas espécies, de igual modo já foram identificadas *B. canis* e *B. ovis* infectando animais domésticos (Poester et al., 2002). A *B. melitensis*, o principal agente etiológico da brucelose caprina e ovina, não foi identificada no Brasil até o presente momento (Poester et al., 2002; Lucero et al., 2008).

Apesar da alta homogeneidade da hibridização de DNA-DNA entre as bactérias do gênero *Brucella* (Verger et al., 1985), estudos recentes demonstraram a presença de *loci* conservados contendo sequências repetitivas de nucleotídeos, onde a análise do número de repetições destes *loci* (Variable Number of Tandem Repeats – VNTR) tem sido utilizada como ferramenta de estudo da brucelose (Whatmore et al., 2006; Le Flèche et al., 2006; Gàrcia-Yoldi et al., 2007; Al Dahouk et al., 2007). Nesse aspecto, a análise de VNTR de vários *loci* (Multiple Locus VNTR Analysis – MLVA) tem sido significativamente importante para investigação epidemiológica da infecção por *Brucella* spp. aplicado a programas de controle e de vigilância epidemiológica da brucelose pela identificação e caracterização de agrupamentos de determinados genótipos (Bricker et al., 2003; Bricker e Ewalt, 2005; Whatmore et al., 2006; Marianelli et al., 2007; Al Dahouk et al., 2007).

Esta técnica compreende oito marcadores (minisatélites) capazes de diferenciar as espécies de *Brucella* spp. e oito (microsatélites) com grau maior de variabilidade das sequências repetitivas de pequenos números de pares de base (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007) e conseqüentemente com maior poder de discriminação entre as amostras, permitindo distinguir amostras em um determinado surto.

O objetivo deste trabalho foi biotipar e genotipar amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos de vários estados do Brasil e avaliar a identificação de possíveis padrões de agrupamentos e distribuição dos biotipos e genótipos de *B. abortus* no país visando

apoiar o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Brasil, 2001).

Material e Métodos

Amostras de *Brucella* spp.

O tamanho amostral foi estimado conforme Struelens (1996), que determina uma coleção superior a 100 amostras, para estudos epidemiológicos desta natureza. Assim para realização deste trabalho foram utilizadas 137 amostras de *B. abortus*, isoladas de bovinos no Brasil, entre 1977 a 2008 provenientes das coleções do Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG (LBA – DMVP – EV – UFMG), do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO / MG) do MAPA, do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e do Instituto Biológico de São Paulo.

Dessas amostras, 38 amostras foram isoladas de bovinos do Estado de Minas Gerais, 31 de animais do Estado do Rio Grande do Sul, 31 de animais do Estado do Pará, 15 de animais do Estado de São Paulo, 14 de animais do Estado de Tocantins e 8 de animais do Estado de Santa Catarina.

Como controle dos procedimentos realizados foram utilizadas as amostras de referência *B. abortus* biovariedade 1 544 = ATCC 23448^T, *B. abortus* biovariedade 2 ATCC 23449, *B. abortus* biovariedade 3 Tulya = ATCC 23450, *B. abortus* biovariedade 4 292 = ATCC 23451, *B. abortus* biovariedade 5 3196 = ATCC 23452, *B. abortus* biovariedade 6 870 = ATCC 23453 e *B. abortus* biovariedade 9 C68 = ATCC 23455, *B. abortus* biovariedade 1 B19 USDA, *B. abortus* biovariedade 1 RB51, *B. melitensis* biovariedade 1 16M = ATCC 23456^T, *B. ovis* Reo 198, *B. suis* biovariedade 1 1330 = ATCC 23444, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* B41, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* Typhimurium

ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Identificação e biotipagem das amostras de *B. abortus*

Após o recebimento no LBA – DMVP – EV – UFMG, todas as amostras foram submetidas aos testes bioquímicos de catalase, oxidase, urease, citrato e redução de nitrato (Mac Faddin, 1980; Alton et al., 1988; OIE, 2008). A confirmação das espécies e das biovariedades de *Brucella* spp. foram determinados pelas provas de crescimento em atmosfera de CO₂ e O₂, teste de aglutinação com acriflavina, produção de H₂S, crescimento na presença de tionina (20 µg/mL e 40 µg/mL) e fucsina básica (20µg/mL) e aglutinação frente a soros anti-A, anti-M e anti-R (Cepanzo - Argentina) (Alton et al., 1988; OIE, 2008).

Além das provas bioquímicas, os DNA de todas as amostras foram testados por PCR para a amplificação do gene *bcs31* (Baily et al., 1992) e pela PCR AMOS (Bricker e Halling, 1994), capaz de diferenciar as espécies de *B. abortus* biovariedade 1, 2 e 4, *B. melitensis* biovariedade 1, *B. ovis* e *B. canis*. Em decorrência das amostras identificadas como *B. abortus* biovariedade 3 serem negativas na PCR AMOS, estas foram analisadas também pela PCR AMOS ERY (Ocampo-Sosa et al., 2005) para a classificação nos subgrupos 3a e 3b

As reações da PCR para o gene *bcs31* foram realizadas em um volume final de 12 µL contendo tampão 1X (50 mM Tris, 1.5mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3) (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil); 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP) (Invitrogen; Carlsbad, CA,USA); 1µM de cada iniciador (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' e 3'-CGCGCTTGCCCTTTCAAGGTCTG - 5') (Invitrogen; Carlsbad, CA,USA); 1 unidade de DNA polimerase (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil) e 50ng de DNA.

Para a PCR AMOS e PCR AMOS ERY as reações foram feitas sob as mesmas

condições, com volume final de 12,5 µL contendo tampão 1X (50 mM Tris, 1.5mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3) (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil); 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 1µM de cada iniciador, (Invitrogen; Carlsbad, CA,USA); 2 unidades de DNA polimerase Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 50ng de DNA. Os iniciadores utilizados na PCR AMOS foram: 5'-ACGAACGGAATTTTTCCAATCCC-3', 5'-AAATCGCGTCCTTGCTGG-TCT-GA-3', 5'-CGGGTTCTGGCACCATCGTCG-3', 5'-CGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG-3', 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3') (Bricker e Halling, 1994) . Para a PCR AMOS ERY foram acrescentados ao protocolo da PCR AMOS mais três iniciadores (5'-CGCCTGCGTGACCTCCAGCTTACCC-3', 5'-GGCCATGACACGCGGCATATAACC-3' e 5'-GCGCAGCGTTGCGGCAATTG-3') (Ocampo-Sosa et al., 2005).

Após a realização do PCR AMOS ERY com o objetivo de diferenciar as amostras identificadas nos testes bioquímicos como *B. abortus* biovariedade 6 de *B. abortus* do subgrupo 3b foi realizado a técnica de análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length polymorphisms - PCR-RFLP) para *omp* 25cd com a enzima de restrição *Ddel* (Garcia-Yoldi, et al., 2005) com todas as amostras biotipadas como *B. abortus* biovariedade 3 ou *B. abortus* biovariedade 6. Para diferenciar e confirmar as amostras biotipadas como *B. abortus* biovariedade 4 foi realizada PCR RFLP *omp* 2b com a enzima de restrição *TaqI* (Cloeckaert, et al. 1995). O PCR-RFLP *omp* 25cd e o *omp* 2b foram realizados na volume final de 25 µL, nas mesmas condições da PCR AMOS. Os iniciadores utilizados na PCR-RFLP *omp* 25cd foram 5'-CCGCCTGCTGTGTCCTGTTTT-3' e 5'-GGCCGCGAAATAGACCAGAA-3' e para o PCR-RFLP *omp* 2b foram 5'-CCTTCAGCCAAATCAGAATG-3' e 5'-GGTCAGCATAAAAAGCAAGC-3'. A digestão do produto final de ambas PCR foi feito conforme as recomendações do

fabricante (Promega; Madison, WI, USA), incubando a 37 °C por duas horas.

O DNA das amostras para execução das análises foi obtido a partir das colônias de *Brucella* spp. suspensas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) inativadas a 85 °C por 2 horas e submetidas à extração do DNA genômico segundo Pitcher et al. (1989). A verificação da pureza e determinação da concentração das amostras de DNA foi realizada espectrofotometricamente (Sambrook e Russel, 2001) e padronizada para ser utilizada na concentração final de 4 ng/µL. A visualização dos produtos amplificados ou digeridos foi realizada em gel de agarose (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) a 1,0% corado com brometo de etídeo a 0,5 mg/mL (Sigma; St. Louis, IL, EUA) (Sambrook e Russel, 2001).

Genotipagem das amostras

Para a definição do perfil genotípico, o DNA de cada amostra foi analisado pela técnica de análise de múltiplos *loci* com VNTR (MLVA-typing) conforme o protocolo de tipagem de *Brucella* spp. descrito por Le Flèche et al., (2006).

Foram utilizados 16 iniciadores para diferentes *loci* com VNTR de *Brucella* spp. (MLVA16) (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007) divididos em dois painéis: Painel 1 composto de oito microsátélites correspondentes aos *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55 e painel 2 composto pelo painel 2A com minisátélites dos *loci* Bruce18, Bruce19 e Bruce21 e painel 2B com minisátélites dos *loci* Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce30 (Tab. 3).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12 µL contendo tampão 1X (50 mM Tris, 1,5mM MgCl₂, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3) (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil); 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 1µM de cada iniciador (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA); 1 unidade de DNA polimerase (Phoneutria; Belo Horizonte, MG, Brasil) e 50ng de DNA. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-borato-EDTA 1X (TBE) corado com brometo de etídeo a 0,5 mg/mL e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados nos painéis 1 e 2 (2A e 2B) do MLVA 16 (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007)

VNTR nome	Iniciador Senso	Iniciador Consenso
Painel 1		
bruce06-BU1322_134bp_408bp_3u	5'-ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG 3'	5'-GCGTGACAATCGACTTTTTGTC-3'
bruce08-RU1134_18bp_348bp_4u	5'-ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC-3'	5'-ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC-3'
bruce11-BRU211_63bp_257bp_2u	5'-CTGTTGATCTGACCTTGAACC-3'	5'-CCAGACAACAACCTACGTCTG-3'
bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u	5'-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA-3'	5'-GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC-3'
1 bruce42-BU424_125bp_539bp_4u	5'-CATCGCCTCAACTATACCGTCA-3'	5'-ACCGCAAAATTTACGCATCG-3'
bruce43-BRU379_12bp_182bp_2u	5'-CATCGCCTCAACTATACCGTCA-3'	5'-ACCGCAAAATTTACGCATCG-3'
bruce45-BRU233_18bp_151bp_3u	5'-ATCCTTGCTCTCCCTACCAG-3'	5'-CGGGTAAATATCAATGGCTTGG-3'
bruce55-BU2066_40bp_273bp_3u	5'-TCAGGCTGTTTCGTCAGTCTT-3'	5'-AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT-3'
Painel 2		
bruce18-BRU339_8bp_146bp_5u	5'-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT-3'	5'-GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG-3'
2A bruce19-BRU324_6bp_163bp_18u	5'-GACGACCCGGACCATGCTT-3'	5'-ACTTCAACCGTAACGTCGTGGAT-3'
bruce 21BRU329_8bp_148bp_6u	5'-CTCATGCGCAACCAAAACA-3'	5'-ATCTCGTGGTCGATAATCTCATT-
bruce04-BRU1543_8bp_152bp_2u	5'-TGACGAAGGGAAGGCAATAAG-3'	5'-CGATCTGGAGATTATCGGGAAG-3'
bruce07-BRU1250_8bp_158bp_5u	5'-GCTGACGGGGAAGAACATCTAT-3'	5'-ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA-3'
2B bruce09-BRU588_8bp_156bp_7u	5'-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC-3'	5'-GGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG-3'
bruce16-BRU548_8bp_152bp_3u	5'-ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT-3'	5'-GGCCATGTTCCGTTGATTTAT-3'
bruce30-BRU1505_8bp_151bp_6u	5'-TGACCGCCAAAACCATATCCTTC-3'	5'-TATGTGCAGAGCTTCATGTTCCG-3'

Fonte: Adaptado de Le Flèche et al., (2006)

Análise dos genótipos

A partir da imagem digital de cada gel (Fig. 1), o tamanho das bandas foi estimado com o auxílio do programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica) e em seguida convertido no número de unidades de repetições em tandem dos nucleótidos para cada *locus* segundo Le Flèche et al. (2006). A análise dos conglomerados foi realizada pelo programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica) através de dendogramas e

a MST (*minimum spanning tree*) utilizando-se coeficiente categórico e o método de ligação de média entre grupos (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean – UPGMA). O índice de diversidade HGDI foi calculado segundo Hunter e Gaston (1988). Os genótipos obtidos foram comparados aos depositados no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>), consultado em 31 de janeiro de 2009).

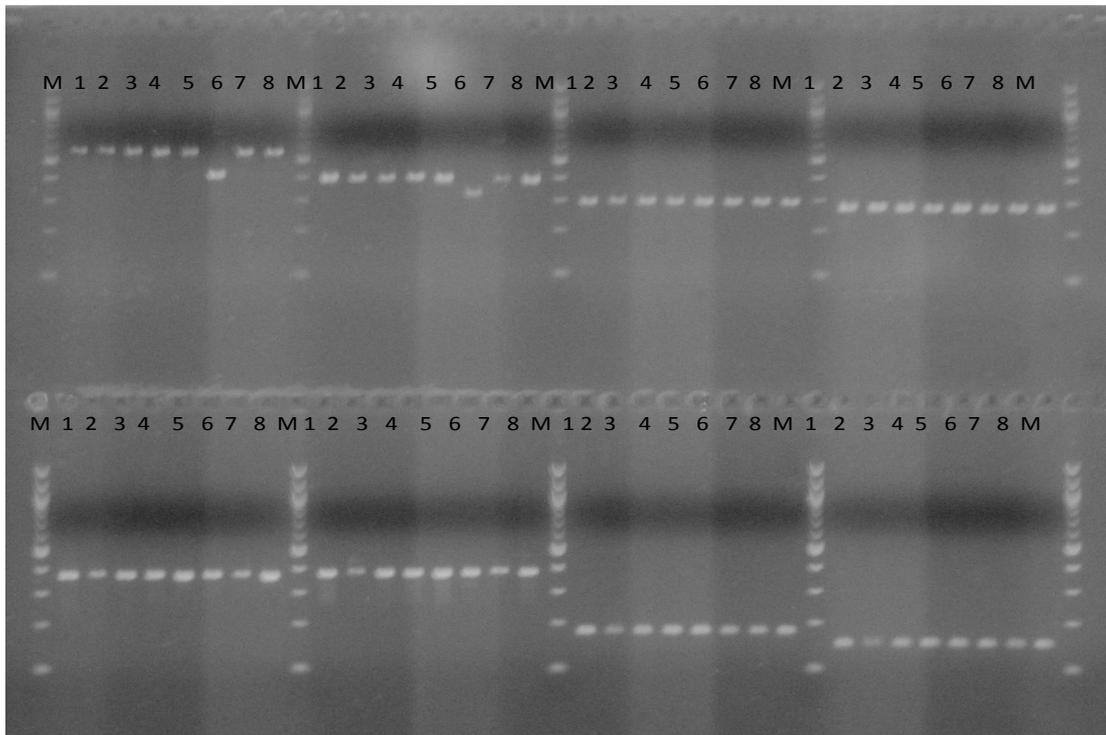


Figura 1 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio a 0,5 mg/mL mostrando produtos amplificados nos oito *loci* estudados do Painel 1. M – Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), 1 a 8 amostras de bovinos isoladas no Brasil de 1977 a 2008: 1- 224, 2 - 223, 3 - 34, 4 - 13a/02, 5 - 138, 6 - 163, 7 - 202 e 8 – 477).

Resultados

Todas as 137 amostras isoladas foram confirmadas como *Brucella* spp. pelo PCR para o gene *bcs31*, aos testes bioquímicos e pelas PCR AMOS e AMOS ERY foram identificadas como *B. abortus*. Noventa e duas (67,1%) das 137 amostras foram identificadas como *B. abortus* biovariedade 1, *B. abortus* biovariedade 2 ou *B. abortus* biovariedade 4 pela PCR AMOS. Estas amostras foram encontradas em todos os Estados estudados, sendo mais freqüente nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Tab. 4). As amostras negativas à PCR AMOS foram isoladas com mais freqüência nos Estados do Pará e Tocantins e só não foram identificadas no Estado de Santa Catarina.

As biovariedades de *B. abortus* encontradas neste estudo pelas provas bioquímicas foram 1, 2, 3, 4 e 6. A biovariedade de *B. abortus* mais frequentemente encontrado foi a biovariedade 1 seguido pela biovariedade 3, biovariedade 6, biovariedade 2 e, a menos freqüente, a biovariedade 4. A distribuição das biovariedades de *B. abortus* em cada Estado e no total das amostras estudadas encontra-se na Tabela 4. O índice de diversidade (HGDI) calculado para a identificação dos biovariedades de *B. abortus* pelos testes bioquímicos clássicos realizados neste estudo foi de 0,6518. Todas as amostras classificadas no teste bioquímico como *B. abortus* biovariedade 3 foram confirmadas como sendo do subgrupo 3b segundo a técnica da PCR AMOS-ERY.

Tabela 4- Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF) nos Estados do Minas Gerais (MG), Pará (PA), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e Tocantins (TO) entre 1977 e 2008.

Origem ¹	Biovariedade de <i>Brucella abortus</i>										Total ²	
	1		2		3		4		6		N	%
	N	% ³	N	%	N	%	N	%	N	%		
MG	23	60,5	10	26,3	2	5,2	-	-	3	7,8	38	27,7
PA	3	9,6	1	3,22	16	51,6	-	-	11	35,4	31	22,6
RS	26	83,9	2	6,4	-	-	1	3,22	2	6,4	31	22,6
SC	6	75,0	2	25,0	-	-	-	-	-	-	8	5,8
SP	12	80,0	-	-	1	6,6	-	-	2	13,3	15	10,9
TO	2	14,3	1	7,1	9	64,3	-	-	2	14,3	14	10,6
Total³	72	52,6	16	11,7	28	20,4	1	0,7	20	14,6	137	100

1 – Estados de Minas Gerais – MG, Pará – PA, Rio Grande do Sul – RS, Santa Catarina - SC, São Paulo – SP, Tocantins - TO; 2 – O percentual se refere à frequência de amostras de *B. abortus* de cada estado em relação ao total de amostras estudadas. 3 – O percentual se refere à frequência do biovariedade dentro de cada linha. O índice de diversidade (Hunter e Gaston, 1988) para a determinação das biovariedades de *B. abortus* foi de 0,6518.

Para diferenciar *B. abortus* biovariedade 3b de *B. abortus* biovariedade 6 foi realizada a PCR-RFLP para o gene *omp 25cd*, que codifica a proteína de membrana externa de 25 kDa de *Brucella* sp. descrito por Garcia-Yoldi et al. (2005), os quais relatam que na biovariedade 6 de *B. abortus* não existe sítios de restrição para a enzima *Ddel*. Porém no nosso estudo não conseguimos obter resultados semelhantes, devido a *Ddel* cortar a amostra de referência utilizada (*B. abortus* biovariedade 6 870) bem como outras amostras de campo classificadas na bioquímica como *B. abortus* biovariedade 6. O produto amplificado foi de 2229 pb. A enzima *Ddel* cortou esta sequência na altura de 556 pb, resultando em duas bandas, sendo uma próxima de 1673 pb e outra com 556 pb (Fig. 2).

Para certificar o único achado de biovariedade 4 de *B. abortus* entre as amostras, além dos testes bioquímicos, utilizamos a técnica do RFLP-PCR para o gene *omp 2b* descrito por Cloeckert et al. (1995), que diferencia pelo padrão do sítio de restrição da enzima *TaqI*, a *B. abortus* biovariedade 1 de *B. abortus* biovariedade 4. A amostra de campo 16/02 isolada no Rio Grande Sul apresentou padrão de restrição idêntico ao da amostra de referência *B. abortus* biovariedade 4 292 (Fig. 3). As quais apresentaram duas bandas a mais do que a *B. abortus* biovariedade 1 544 ATCC 23448^T. A primeira banda na altura de 770 pb e a segunda com 440 pb, concordando com o resultado dos testes bioquímicos.

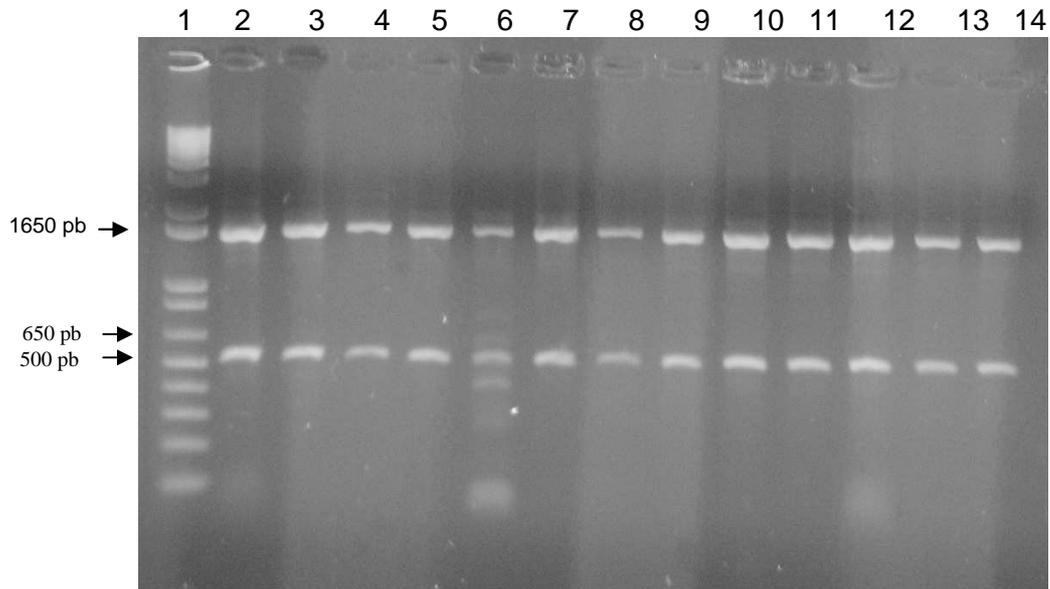


Figura 2- Padrão de restrição da amplificação do gene *omp 25cd*, pela enzima *Ddel*. 1- Marcador de peso molecular (1Kb plus- Invitrogen), 2- *B. abortus* biovariedade 1 544 , 3- *B. abortus* biovariedade 6 870, 4- *B. abortus* biovariedade 6 870 , 5- *B. abortus* biovariedade 6 870 6- *B. abortus* biovariedade 3 Tulya, 7- *B. melitensis* biovariedade 1 16M, 8 a 14 isolados de campo de *Brucella abortus* no Brasil de 1977 a 2008.: 8 - amostra 62 (*B. abortus* biovariedade 3), 9 – amostra 66 (*B. abortus* biovariedade 3), 10 – amostra 63 (*B. abortus* biovariedade 3), 11 - amostra J 24 (*B. abortus* biovariedade 6), 12 – amostra SP 3 (*B. abortus* biovariedade 6), 13 – amostra 17 a/02 (*B. abortus* biovariedade 6), 14 – amostra 17b/02 (*B. abortus* biovariedade 6).

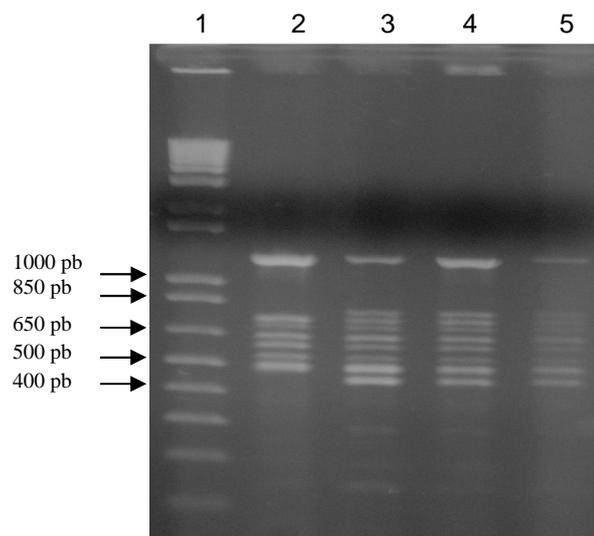


Figura 3 - Padrão de restrição da amplificação do gene *omp 2b*, restringido pela enzima *TaqI*. 1- Marcador de peso molecular (1Kbp plus- Invitrogen), 2- *B. abortus* biovariedade 1 544 ATCC 23448^T, 3 - *B. abortus* biovariedade 4 292, 4- *B. abortus* biovariedade 4 292 , 5- isolados de campo de *B. abortus* amostra 16/02.

Quanto a técnica de tipagem molecular (MLVA16) foram identificados nove genótipos pelo painel 1 (Tab. 5), quatro deles (28, 32, 33 e 40) já foram descritos por Lè Fleche et al., (2006) e pelo MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>). Os outros cinco genótipos encontrados – I, II, III, IV e V –, ainda não foram relatados pelo MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>). Estes genótipos, como podem ser verificados na Figura 4, apresentaram um ou mais *loci* dos minisatélites painel 1 com número de repetições diferentes do publicado por LeFlèche et al., (2006) ou presentes no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>) e por isto foram classificados com uma numeração diferente da forma convencional. A frequência dos genótipos identificados pelo painel 1 e sua distribuição nos estados estudados estão descritos na Tabela 5. O HGDI para a genotipagem pelo painel 1 foi de 0,54.

Para a painel 2A o HGDI foi de 0,74, sendo encontrados 13 genótipos, 5 deles descritos (genótipos 8, 30, 32, 33 e o 34) por Lè Fleche et al., (2006) e oito genótipos novos denominados de 2A1 a 2A8. O genótipo 33 foi o mais frequente entre as amostras estudadas (62/137), seguido pelos genótipos 32 (28/137), 34 (13/137), 8 (10/137) e 30 (8/137). Quanto aos genótipos ainda não publicados o 2A3 foi o mais frequente (4/137), seguido pelos 2A2 e 2A8 (3/137).

No Painel 2B por sua vez, encontramos 63 genótipos diferenciados, sendo 13 descritos (18, 29, 30, 45, 52, 53, 58, 64, 66, 87, 88, 90 e o 91) e 50 genótipos ainda não descritos, identificados de 2B1 a 2B50; o HGDI para estes *loci* foi de 0,97. Desses genótipos o mais freqüente foi o genótipo 91 (11/137), seguido pelos 2B19 (9/137), 2B4 (8/137), 2B5 (6/137), 18 e 2B8 (5/137). Cada um dos genótipos 30, 53, 2B17, 2B22, 2B48 foram observados em 4 das 137 amostras estudadas e os genótipos 52, 58, 90, 2B16, 2B30, 2B44 2B46 em 3.

O HGDI de cada um dos 16 *locus* conforme as biovariedades de *B. abortus* identificados no Brasil de amostras isoladas entre 1977 a 2008, pode ser observado na Tabela 6. O painel 1 obteve índices de diversidade abaixo de 0,16. No painel 2A, os *loci* de maior diversidade foram os *loci* 19 e 21. O maior índice de diversidade observado no painel 2A foram para as amostras de *B. abortus* biovariedade 2 e biovariedade 6, com o HGDI de 0,74 e 0,73 respectivamente. O painel 2B foi o que apresentou o maior índice de diversidade entre as biovariedades com o HGDI variando de 0,93 a 0,96, onde a biovariedade 1 de *B. abortus* apresentou o maior índice de diversidade. O HGDI para o MLVA16 (Painel 1, 2A e 2B) foi de 0,98 diferenciando 89 genótipos dentre as 137 amostras de *B. abortus* analisadas, que foram denominados de A a CY, para efeito de estudo, visto que a combinação destes genótipos não foram publicados no MLVAbank for Bacterial Genotyping.

A partir do número de unidades de repetições de cada *locus* foi gerado um dendrograma, com o auxílio do programa BioNumerics para verificar a formação de agrupamentos, utilizando-se coeficiente categórico e UPGMA (Fig. 5), onde foi possível a identificação de dois conglomerados principais, denominados de I e II. A partir do dendrograma foi gerado uma árvore sem raiz (*Minimum Spanning Tree* – MST), utilizando parâmetros de coeficiente categórico e de parsimônia, que demonstrou claramente os dois conglomerados (Fig. 6).

Dos genótipos encontrado no MLVA 16 o mais frequente foi o genótipo denominado de J encontrado nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina. Foi possível observar a distribuição de alguns genótipos menos frequentes além do J, como o D com 9,0 % (8/89) encontrado em Minas Gerais e Rio Grande do Sul, o AB com 5,6% (5/89) e o U (4,5%) ambos encontrados no Pará e Tocantins, o H com 3,4% (3/89) distribuído em Minas Gerais, Pará e Tocantins, o R com 3,3% (3/92) isolado em Minas Gerais e São Paulo.

O T, AC e BE com 2,2% (2/89) encontrados no Pará e no Tocantins, os L e M, ambos com 2,2%. O L encontrado em Minas Gerais e Santa Catarina e o M, encontrado no Rio Grande do Sul e São Paulo. O perfil de unidades de repetições destes novos genótipos pelo painel 2A e 2B foram ilustrados na Figura 7.

A comparação dos resultados dos testes bioquímicos, da genotipagem pelo painel 1 e da PCR-AMOS pode ser visualizada na Tabela 7, onde das 137 amostras, 68,6% (94/137) concordaram entre os resultados das três técnicas utilizadas. Foram observados cinco situações de conflito em pelo menos um dos testes. Vinte e três amostras (16,8%) que foram classificadas

como *B. abortus* biovariedade 3 pelas provas bioquímicas, foram negativas à PCR-AMOS, mas apresentaram o genótipo 40. Três amostras também foram classificadas como *B. abortus* biovariedade 3, mas foram positivas à PCR-AMOS e apresentaram genótipo 40. Uma amostra que foi identificada como *B. abortus* biovariedade 4 pelos testes fenotípicos, foi positiva à PCR-AMOS, mas apresentou genótipo 32. Quinze amostras (10,9%) positivas à PCR-AMOS e classificadas como *B. abortus* biovariedade 2 pelos testes bioquímicos, apresentaram genótipo 28. E uma outra amostra de *B. abortus* biovariedade 2, positiva à PCR-AMOS apresentou genótipo 33.

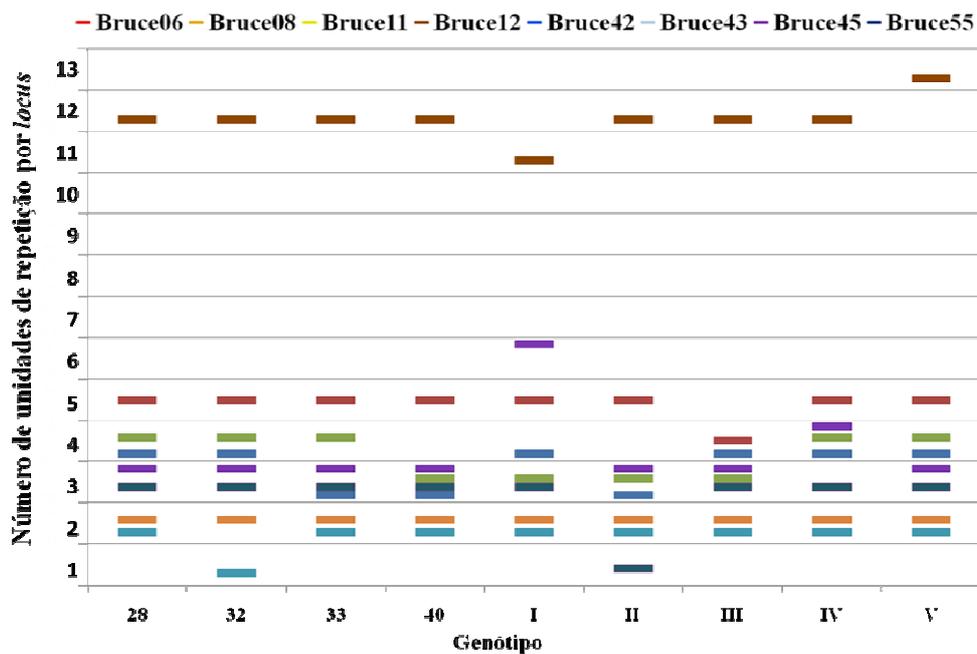


Figura 4 – Genótipos das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil definidos pelo painel 1 do MLVA (Le Flèche et al., 2006). Representação gráfica do número de unidades de repetição encontrados para os loci Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55 do painel 1 do MLVA para cada um dos genótipos encontrados.

Tabela 5 - Genótipos, determinados pelo painel 1 do MLVA¹ (Le Flèche et al., 2006), de *Brucella abortus* isoladas de bovinos abatidos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF) nos Estados do Minas Gerais (MG), Pará (PA), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP) e Tocantins (TO), entre 1977 a 2008.

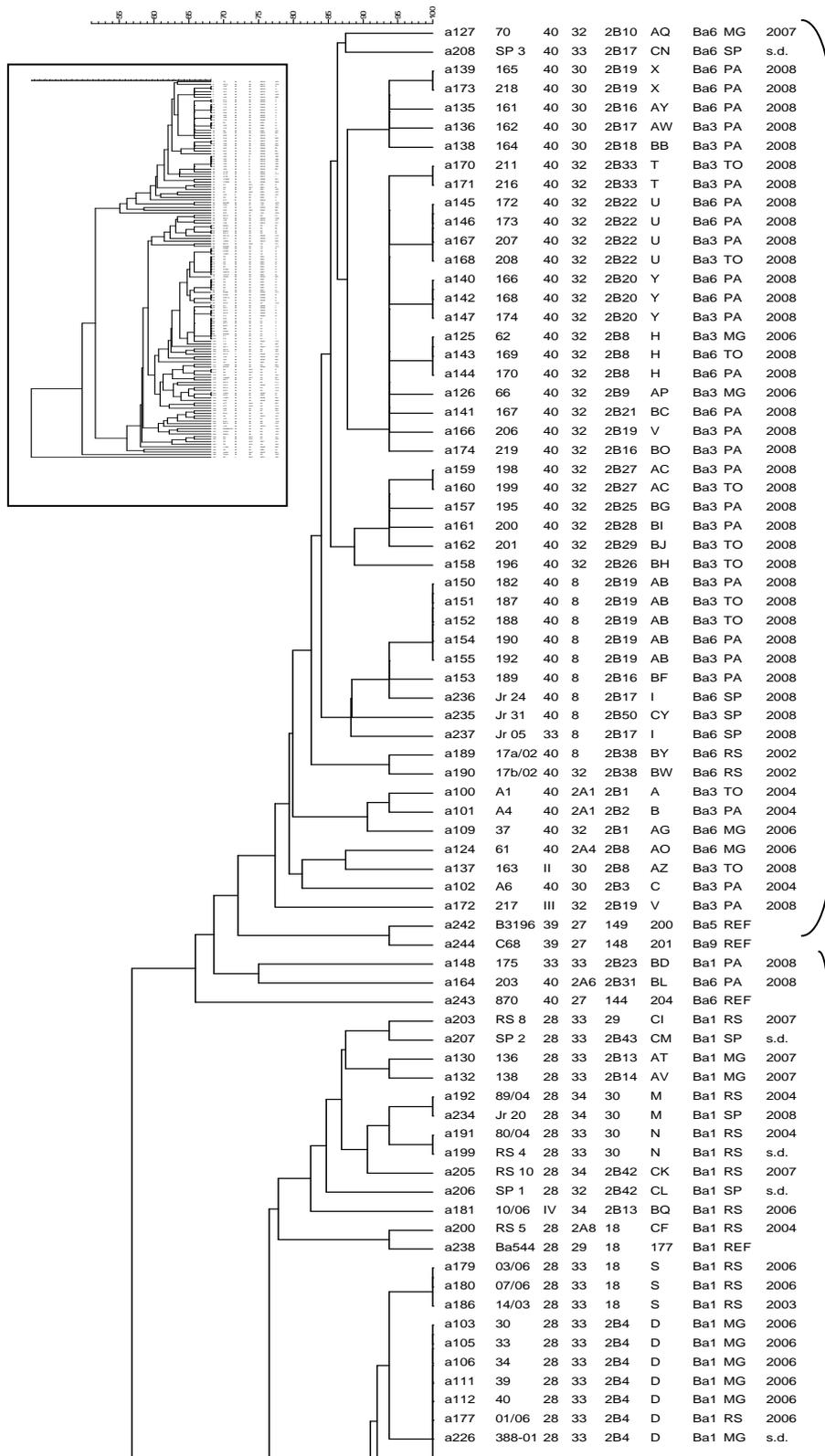
Origem	Genótipo																		Total	
	28		32		33		40		I		II		III		IV		V		N	% ⁴
	N ²	% ³	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
MG	33	86,0	-	-	-	-	5	13,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	27,7
PA	2	6,4	-	-	2	6,4	26	83,9	-	-	-	-	1	3,2					31	22,6
RS	27	87,9	1	3,2	-	-	2	6,4	-	-	-	-	-	-	1	3,2	-	-	31	22,6
SC	8	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	5,8
SP	9	60,0	-	-	1	6,6	3	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	13,3	15	10,9
TO	3	21,4	-	-	-	-	9	64,3	1	7,1	1	7,1	-	-	-	-	-	-	14	10,2
Total⁵	82	59,9	1	0,7	3	2,2	45	32,8	1	0,7	1	0,7	1	0,7	1	0,7	2	1,5	137	100

1 – O painel 1 do MLVA é composto pelos *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43 e Bruce55 (Le Flèche et al., 2006). 2 – Número de amostras. 3 – O percentual se refere à frequência da biovariedade dentro de cada estado. 4 – O percentual se refere à frequência de amostras de *B. abortus* de cada estado em relação ao total de amostras estudadas. 5 – O percentual se refere à frequência de cada biovariedade no total de amostras estudadas. O índice de diversidade (Hunter e Gaston, 1988) para a determinação dos genótipos de *B. abortus* determinados pelo painel 1 foi de 0,5368.

Tabela 6 - Índice de Diversidade (HGDI) calculado para cada *locus* e para os painéis 1, 2A, 2B e MLVA16 segundo os biovariedades de *Brucella abortus* isolados de bovinos no Brasil de 1977 a 2008.

Painel / <i>Locus</i>	Biovariedade 1		Biovariedade 2		Biovariedade 3		Biovariedade 6	
	Tipos ¹	HGDI ²	Tipos	HGDI	Tipos	HGDI	Tipos	HGDI
Painel 1	5	0,16	2	0,07	3	0,14	2	0,1
Bruce06	2	0,05	2	0,12	2	0,07	2	0,09
Bruce08	2	0,03	1	0,00	2	0,07	1	0,00
Bruce11	2	0,03	1	0,00	1	0,00	2	0,09
Bruce12	3	0,08	1	0,00	1	0,00	2	0,09
Bruce42	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
Bruce43	1	0,00	1	0,00	1	0,00	1	0,00
Bruce45	2	0,03	1	0,00	1	0,00	2	0,09
Bruce55	1	0,00	1	0,00	2	0,07	1	0,00
Painel 2A	7	0,42	4	0,74	4	0,62	7	0,73
Bruce18	3	0,18	1	0,00	1	0,00	4	0,27
Bruce19	2	0,13	2	0,50	3	0,37	3	0,40
Bruce21	2	0,26	3	0,62	2	0,35	5	0,54
Painel 2B	38	0,96	10	0,93	18	0,95	12	0,95
Bruce04	4	0,49	2	0,50	9	0,88	8	0,87
Bruce07	3	0,46	2	0,12	2	0,07	3	0,33
Bruce09	4	0,08	1	0,00	2	0,07	2	0,09
Bruce16	6	0,70	3	0,59	2	0,35	2	0,18
Bruce30	6	0,62	4	0,67	3	0,20	2	0,18
MLVA16	48	0,93	14	0,98	21	0,97	16	0,98

1 – Número de genótipos; 2 – Índice de diversidade calculado segundo Hunter e Gaston (1988)



Cont...

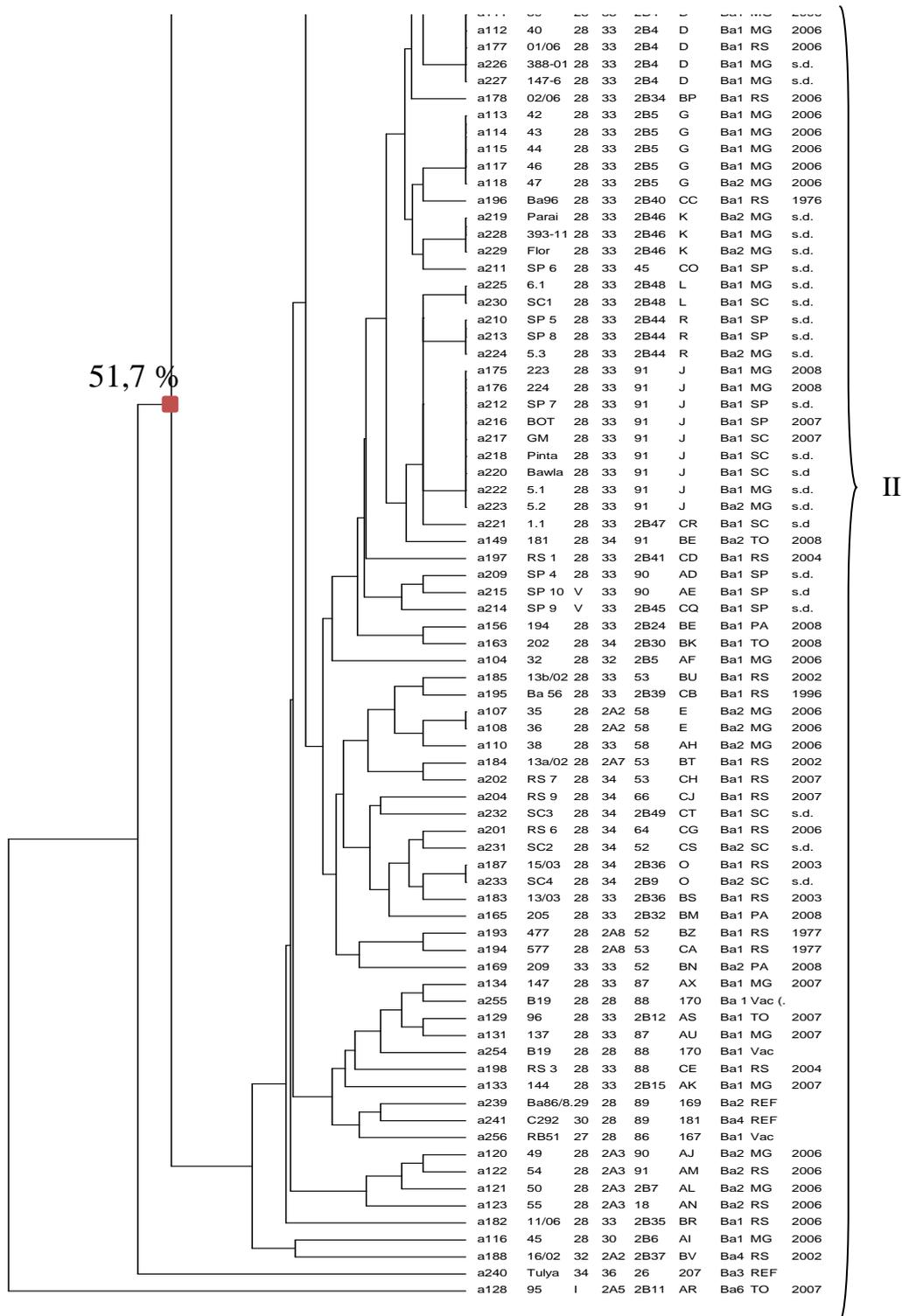
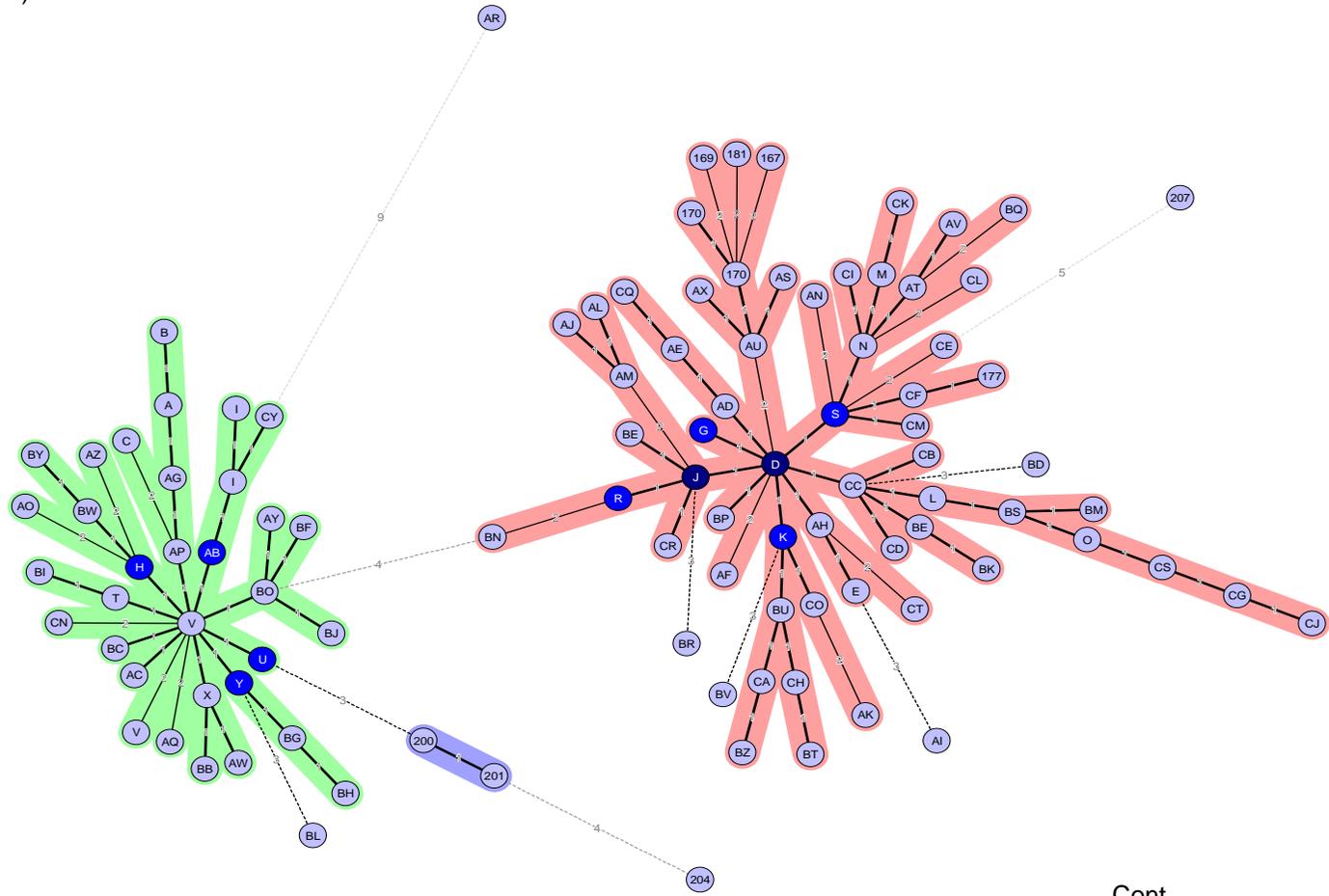


Figura 5 – Dendrograma obtido a partir da genótipos pelo MLVA16 das 137 amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos abatidos no Brasil, com as 7 biovariedades de *B. abortus* de referência e as amostras vacinais RB51 e B19. Nas colunas, da esquerda para direita, estão a identificação das amostras, o genótipo obtido pelos painéis 1, 2A, 2B e o MLVA16, os biovares, a origem do animal de onde as amostras foram isoladas e o ano de isolamento. I e II denotam os dois grandes conglomerados encontrados em torno dos genótipos 40 e 28, respectivamente, pelo painel 1 e que apresentam 51,7% de similaridade entre eles.

a)



Cont...

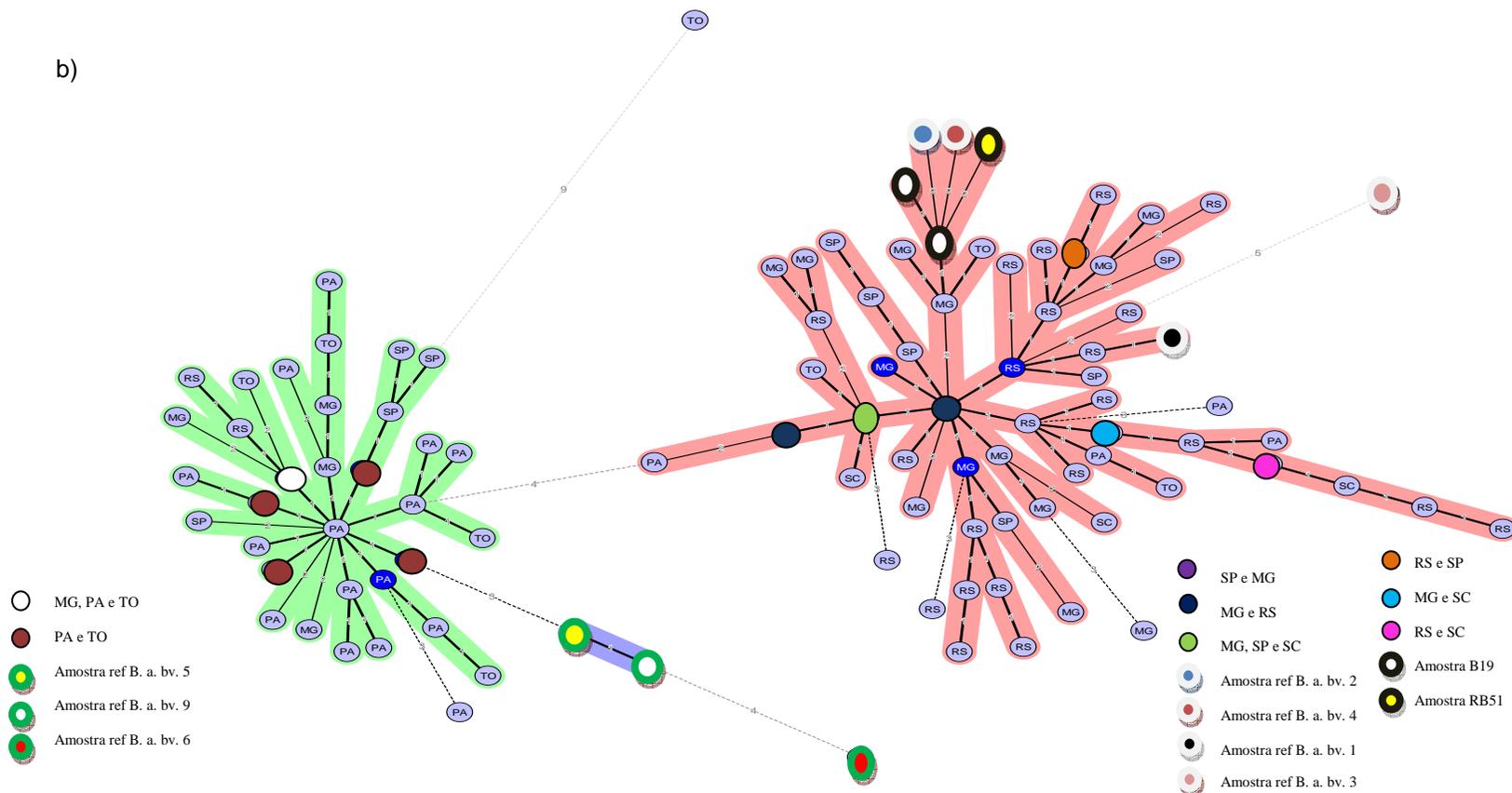


Figura 6 - *Minimum spanning tree* (MST) calculado pelo coeficiente categórico e de parcimônia a partir do dendrograma das amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil de 1977 a 2008, juntamente com as 7 amostras de referência de *B. abortus*, e amostras vacinais B19 e RB51 conforme a Fig. 5. a) Identificação do genótipo das amostras conforme o MLVA16. b) Origem dos genótipos conforme os Estados de origem dos animais de onde as amostras foram isoladas, na mesma posição da fig a).

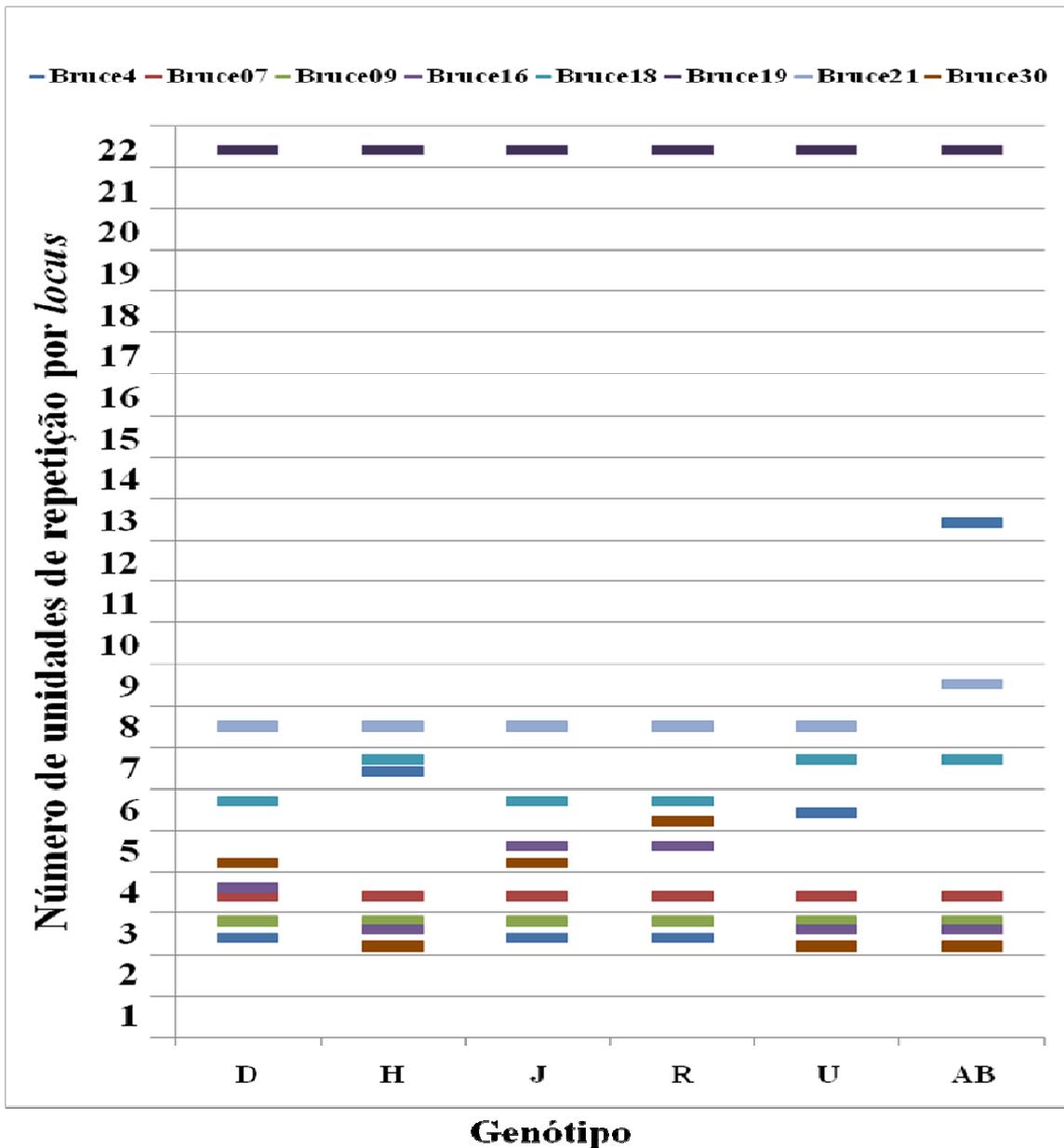


Figura 7 – Genótipos das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil definidos pelo painel 2A e 2B do MLVA (Le Flèche et al., 2006, Al Dahouk et al., 2007). Representação gráfica do número de unidades de repetição encontrados para os *loci* Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55 do painel 2 do MLVA para cada um dos cinco genótipos mais frequentes encontrados.

Tabela 7 - Biotipagem, PCR AMOS e genotipagem pelo painel 1 do MLVA 16 das amostras de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil de 1977 a 2008.

Biovar	PCR AMOS	Genótipo																		Total ³	
		28		32		33		40		I		II		III		IV		V		N	%
		N ¹	% ²	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%				
1	Pos	67	48,9	-	-	2	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,7	2	1,5	72	52,6
	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
2	Pos	15	10,9	-	-	1	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	11,7
	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
3	Pos	-	-	-	-	-	-	3	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2,2
	Neg	-	-	-	-	-	-	23	16,8	-	-	1	0,7	1	0,7	-	-	-	-	25	18,6
4	Pos	-	-	1	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,7
	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
6	Pos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
	Neg	-	-	-	-	-	-	19	13,9	1	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	20	14,6
Total ⁴	-	82	59,9	1	0,7	3	2,2	45	32,8	1	0,7	1	0,7	1	0,7	1	0,7	2	1,5	137	100

1 – Número de amostras. 2 – O percentual se refere à frequência do genótipo dentro de cada biovariedade. 3 – O percentual se refere à frequência de cada biovariedade de *B. abortus* pelo resultado da PCR AMOS em relação ao total de amostras estudadas. 4 – O percentual se refere à frequência de cada genótipo no total de amostras estudadas.

Discussão

As biovariedades de *B. abortus* encontradas neste estudo pelas provas bioquímicas foram 1, 2, 3, 4 e 6 (Tab. 4), sendo que estas duas últimas não haviam sido descritas no Brasil até o presente momento. Conforme o Subcomitê sobre Taxonomia de *Brucella* do Comitê Internacional de Sistemática de Procariotas, a *B. abortus* possui oito biovariedades, (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9) (Osterman e Moryón, 2006), que são diferenciados por testes de sensibilidade a corantes (tionina e fuccina básica), requerimento de CO₂, produção de H₂S e presença de antígenos de superfície (A ou M) (Alton et al., 1988; OIE, 2008).

A *B. abortus* biovariedade 1 foi a mais frequente entre as amostras isoladas de bovinos no país, concordando com os achados anteriores descritos no Brasil (Langoni et al., 2000; Poester et al., 2002; Megid et al., 2005) e da maioria das regiões no mundo (Corbel, 1989; Bricker e Ewalt, 2005; Lucero et al., 2008).

Interessante, as amostras de *B. abortus* biovariedade 2 isoladas no presente estudo, assim como as isoladas por Megid et al. (2005), não necessitaram da adição de soro ao meio de cultivo para seu isolamento como regularmente descrito (Alton et al., 1988; OIE, 2008).

Das duas biovariedades até então não relatados no Brasil que foram observados no presente estudo, a *B. abortus* biovariedade 4 só foi isolada de um bovino oriundo do Rio Grande do Sul, diferente de *B. abortus* biovariedade 6, que foi encontrada em todos os estados estudados com exceção de Santa Catarina.

De acordo com Corbel (1989) e Hirsh e Zee (2003), as biovariedades de *B. abortus* possuem distribuições geográficas distintas. A *B. abortus* biovariedade 1 e *B. abortus* biovariedade 2 possuem distribuição mundial, enquanto *B. abortus* biovariedade 3 é encontrada predominantemente na Itália, Índia, no Egito e na África. A biovariedade 5 é encontrado mais comumente na Alemanha e no Reino Unido

(Hirsh e Zee, 2003), mas também já foi identificada na França (Garin-Bastuji, 1993). As biovariedades 4 e 6 já foram descritas no México e na França, porém com frequência inferior as biovariedades 1, 2 e 3 (Garin-Bastuji, 1993; Luna-Martínez et al., 2002). A *B. abortus* biovariedade 4 também foi descrita no Canadá (Ragan, 2002), Chile, Equador e em Cuba (Garcia-Carillo et al., 1972). Na Índia, *B. abortus* biovariedade 1 é a mais freqüente seguido pela *B. abortus* biovariedade 3, porém as biovariedades 4, 6 e 9 também já foram isoladas (Renukaradya et al., 2002).

No presente estudo, *B. abortus* biovariedade 1 foi encontrada em todos os seis estados estudados, sendo a biovariedade mais freqüente nos Estados de Minas Gerais, do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e de São Paulo. A *B. abortus* biovariedade 2 foi encontrada nos Estados de Minas Gerais, do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e do Pará, estando em segundo lugar dentre as biovariedades mais freqüente nos Estados de Minas Gerais, do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

Uma hipótese que pode explicar a grande frequência de isolamento dessas biovariedades em bovinos do país é que desde do início da colonização do Brasil, há importação de bovinos (Vercesi Filho et al., 2002), de regiões onde estas duas biovariedades (1 e 2) são ou foram endêmicas (Renukaradya et al., 2002; Corbel et al., 2006; Lucero et al., 2008), os quais foram observados no presente estudo e em relatos anteriores (Langoni et al., 2000; Poester et al., 2002; Megid et al., 2005).

Nos Estados do Pará e do Tocantins, *B. abortus* biovariedade 3 foi a mais freqüente encontrada, sendo também descrita nos Estados de Minas Gerais e de São Paulo, porém com menor frequência de isolamento nestes Estados. Como todos os isolados de *B. abortus* biovariedade 3 identificados no presente estudo foram classificados com sendo do sub-grupo 3b demonstra que estas amostras estão mais relacionadas com as amostras de *B. abortus* biovariedade

3 de origem européia do que com as amostras de origem africana (Cloekaert et al., 2003; Ocampo-Sosa et al., 2005; Ica et al., 2008), o que também condiz com a origem de grande parte dos animais importados para o Brasil que são de origem européia ou indiana (Renukaradya et al., 2002; Vercesi Filho, et al., 2002).

A *B. abortus* biovariedade 4, isolada de apenas um bovino do Estado do Rio Grande do Sul sugere que sua origem provavelmente vem dos países fronteiriços a este Estado, como a Argentina onde esta biovariedade de *B. abortus* já foi encontrada (Lucero et al., 2008).

A maior frequência de *B. abortus* biovariedade 6 foi no Estado do Pará, onde 55% das amostras desta biovariedade foram isoladas. Esta biovariedade de *B. abortus* não havia sido descrita até o presente momento na América do Sul. A origem da infecção por esta biovariedade no Brasil não é muito clara, mas *B. abortus* biovariedade 6 é uma das mais frequentes biovariedades descritas na Índia, país de origem das raças zebuínas cuja população predomina no Estado do Pará e na maior parte das áreas de produção de bovinos de corte do Brasil (Vercesi Filho, et al., 2002, Renukaradya et al., 2002; Embraba, 2006).

A distinção da biovariedade 6 com a 3 só foi possível pelas provas bioquímicas. A técnica do RFLP para o gene *omp 25cd*, descrita por Garcia-Yoldi et al. (2005), quais relatam que na biovariedade 6 de *B. abortus* não existe sítios de restrição para a enzima *Ddel*, não foi possível de ser reproduzida em nossos experimentos para a diferenciação da biovariedade 6 com as demais, provavelmente em função daqueles autores terem utilizado uma outra amostra de biovariedade 6, a de número 88.21 e não a amostra de referência, a *B. abortus* biovariedade 6 870.

O MLVA para genotipagem de *Brucella* spp. é composto de 3 painéis, sendo o painel 1 o que apresenta uma variabilidade moderada quando comparado aos outros dois painéis denominados de painel 2A e 2B que são hipervariáveis (Le Flèche et al., 2006), e têm

sido utilizados recentemente para genotipar amostras de *Brucella* spp. (Bricker et al., 2003; Bricker e Ewalt, 2005; Whatmore et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007).

Esta técnica compreende oito marcadores (minisatélites) capazes de diferenciar as espécies de *Brucella* spp. (painel 1) e oito microsátélites (painel 2A e 2B) hipervariáveis (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007), com maior poder de discriminação entre as amostras e maior grau de polimorfismo, sendo muito eficiente para distinguir amostras de um determinado surto. Apesar de agrupar corretamente as amostras em relação às espécies de *Brucella*, o MLVA não consegue identificar as biovariedades de *Brucella* spp. provavelmente em função das altas taxas de mutação de alguns dos *loci*, não substituindo desta forma, a caracterização fenotípica clássica através das provas bioquímicas (LeFleche, et al., 2006). Esta afirmação foi claramente evidenciada neste estudo, em que três genótipos (28, 33 e 40) apresentaram amostras de *B. abortus* de mais de uma biovariedade (Tab. 7).

O genótipo mais frequente dentre os isolados de *B. abortus* no Brasil foi o genótipo 28 distribuído em todos os seis Estados estudados (Tab. 5), sendo o mais frequente nos Estados de Minas Gerais, do Rio Grande do Sul, de São Paulo e de Santa Catarina, onde foi o único genótipo encontrado dentre os oito isolados de *B. abortus* desse Estado. O genótipo 28, geralmente relatado como presente entre as amostras de *B. abortus* biovariedades 1 e 4 descritas no Estados Unidos, Costa Rica, Suíça, França, Itália e Alemanha (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVANet/>), foi encontrado no presente estudo em amostras de *B. abortus* biovariedade 1 e na quase totalidade das amostras de *B. abortus* biovariedade 2 (15/16) estudadas.

O genótipo 40 foi o segundo genótipo mais frequente, encontrado em cinco dos Estados estudados, com exceção de Santa Catarina. E o principal genótipo encontrado nos Estados do Pará e do Tocantins e é o genótipo mais frequente nas amostras de *B. abortus* biovariedade 6 (95,0%) e *B. abortus*

biovariedade 3 (92,9%) isoladas neste estudo. Isto justifica a distribuição geográfica deste genótipo, pois essas duas biovariedades foram também as predominantes nos Estados do Pará e de Tocantins. Este genótipo foi primariamente relatado em amostras de *B. abortus* biovariedade 6 isoladas na África (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>).

Neste estudo, o genótipo 32, descrito em amostras de *B. abortus* biovariedade 1 isoladas na Alemanha (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>), foi encontrado na única amostra de *B. abortus* biovariedade 4 isolada, oriunda de um animal do Estado do Rio Grande do Sul.

As amostras encontradas neste estudo como sendo do genótipo 33, descritas no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>) em amostras de *B. abortus* biovariedade 1 encontrada na França, foram todas classificadas na biotipagem como *B. abortus* biovariedade 3, isoladas dos Estado de Pará (2) e de São Paulo (1). A ausência de dados epidemiológicos mais consistentes destes isolados impossibilita a melhor compreensão sobre a circulação deste genótipo em regiões tão distantes do Brasil.

Dentre os novos genótipos descritos pelo painel 1, os genótipos I e II foram encontrados no Estado do Tocantins em amostras de *B. abortus* biovariedade 3. As principais diferenças do genótipo I no painel 1 é a presença de 11 unidades de repetição no *locus* Bruce12 e de seis unidades de repetição no *locus* Bruce45. Já o genótipo II apresenta apenas uma unidade de repetição no *locus* Bruce55. O genótipo III foi encontrado no Estado do Pará em amostras de *B. abortus* biovariedade 3 e sua principal característica é a presença de apenas quatro unidades de repetição do *locus* Bruce08. O genótipo IV foi caracterizado principalmente por apresentar quatro unidades de repetição no *locus* Bruce45 e foi encontrado em uma amostra de *B. abortus* biovariedade 1 isolada no Rio Grande do Sul. As amostras do genótipos V foram isoladas no Estado de São Paulo e possuem como característica treze

repetições no *locus* Bruce12. Todos estes novos genótipos ainda estão representados por uma única amostra, salvo o genótipo V que possui duas amostras isoladas no Estado de São Paulo, e estudos sistemáticos nas regiões onde eles foram detectados podem trazer maiores informações sobre sua importância.

O índice de diversidade (HGDI) encontrado de 0,54 para o painel 1 foi menor do que a diversidade encontrada pelas provas bioquímicas (0,65), não sendo este painel muito discriminatório entre as biovariedades de *Brucella abortus* (Tab. 6). Provavelmente isso tenha ocorrido porque ao Painel 1 mais de um biovariedade apresentou o mesmo genótipo (Tab. 7).

O HGDI do painel 2A, de 0,74, está de acordo com o observado por Al Dahouk et al. (2007) que analisou 128 isolados humanos de *B. mellitensis* e encontrou que o painel 2A tem em média um índice de diversidade menor que 0,75. Este painel diferenciou principalmente as biovariedades 2 e 6 de *B. abortus* (Tab. 6) sendo encontrados cinco genótipos (8, 30, 32, 33 e 34) já descritos no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>) e oito novos genótipos (2A1 A 2A8).

No Painel 2B por sua vez, encontramos 63 genótipos diferenciados sendo 13 já descritos (18, 29, 30, 45, 52, 53, 58, 64, 66, 87, 88, 90 e o 91) no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>) e 50 genótipos ainda não descritos (2B1 a 2B50). O painel 2B apresentou um índice de diversidade de 0,97, explicando a diferença entre a quantidade de genótipos encontrados neste painel com os outros dois. O painel 2B contém os marcadores de maior variabilidade com índice de diversidade geralmente superior a 0,80, confirmando a indicação de sua utilização, juntamente com o Painel 2A para a resolução de amostras relacionadas a surtos da doença (Le Flèche et al, 2006; Whatmore et al., 2006; Al-Dahouk et al., 2007). Comparando-se os índices de diversidade para o painel 2A e 2B observados no presente estudo e os

descritos na literatura (Le Flèche et al., 2006; Whatmore et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007), podemos concluir que esses marcadores foram eficazes na diferenciação das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil, principalmente quando comparados à tipagem pelos testes bioquímicos.

A genotipagem realizada pelo MLVA16 identificou 89 genótipos das 137 amostras de *B. abortus* analisadas, diferentes daqueles descritos no MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>) até o presente momento. A diferença entre o número de genótipos identificados pelo painel 1 e pelo painel 2 é decorrência da hipervariabilidade dos *loci* deste segundo painel (Le Flèche et, 2006; Whatmore et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007).

Os resultados da genotipagem pelos três painéis mostram que existe uma maior circulação dos mesmos genótipos entre as regiões vizinhas, como ocorreu entre os Estados do Pará e do Tocantins (genótipos AB, U, T, AC e BE) na Região Norte, e entre os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul nas Regiões Sul e Sudeste (J, D, L e M). Porém o genótipo H foi encontrado tanto na Região Norte (Pará e Tocantins) como no Sudeste (Minas Gerais).

O dendrograma e a árvore sem raiz (Fig. 5 e 6) mostraram que as amostras de *B. abortus* isoladas em seis Estados brasileiros apresentaram-se bem definidas em dois grandes conglomerados principais com similaridade de 51,6%. O conglomerado I agrupou principalmente as amostras de *B. abortus* do genótipo 40 e as amostras dos genótipos 33 (2/3), II e III, distribuídas em cinco dos seis Estados estudados, com exceção de Santa Catarina.

No conglomerado I também se localizaram as amostras de referência *B. abortus* biovariedade 5 3196 = ATCC 23452, *B. abortus* biovariedade 6 870 = ATCC 23453 e *B. abortus* biovariedade 9 C68 = ATCC 23455. O conglomerado II agrupou principalmente as amostras de *B. abortus* do genótipos 28, IV, 33 (1/3) e V, assim como

as amostras de referência *B. abortus* biovariedade 1 544 = ATCC 23448^T, *B. abortus* biovariedade 2 = ATCC 23449 e *B. abortus* biovariedade 4 292 = ATCC 2345 e as amostras vacinais *B. abortus* biovariedade 1 B19 = BCCN V1 e *B. abortus* biovariedade 1 RB51 = BCCN V5.

Os agrupamentos realizados pelo dendrograma foram feitos principalmente a partir do *locus* Bruce04 que foi o de maior variabilidade, seguido pelo *locus* Bruce19 e depois pelo *locus* Bruce30, apresentando primeiro amostras com maior número de unidades de repetição, posicionando os com menor número de repetições em sequência.

Duas amostras ficaram separadas dos dois agrupamentos: a amostra *B. abortus* biovariedade 3 Tulya = ATCC 23450, isolada na África, genótipo MLVA16 207, e a amostra *B. abortus* biovariedade 6, amostra 95, isolada no Estado do Tocantins, genótipo MLVA16 AR evidenciando que estas amostras são mais distante das outras amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil (Fig. 5). Estes dados também podem ser visualizados pela árvore sem raiz (MST) (Fig. 6) gerada a partir do dendrograma, demonstrando a distribuição dos genótipos por região e o parente mais próximo dentro dos isolados. A amostra 95 agrupou próxima do genótipo 40 e a amostra Tulya mais próxima do genótipo 28.

A comparação entre os resultados dos testes bioquímicos, da genotipagem pelo painel 1 e do PCR-AMOS das 137 amostras, demonstrou que 68,6% apresentaram o mesmo resultado nos três testes.

As 21 amostras que foram classificadas como *B. abortus* biovariedade 3 genótipo 40 e foram negativas no PCR-AMOS, as 15 amostras de *B. abortus* biovariedade 2 genótipo 28 e positivas no PCR-AMOS, uma amostra de *B. abortus* biovariedade 2 genótipo 33 e positiva no PCR-AMOS e a amostra de *B. abortus* biovariedade 4 genótipo 32 e positiva no PCR-AMOS (Tab. 7) provavelmente são reflexo do fato que existem poucas descrições de amostras dessas três biovariedades genotipadas

(<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVANet/>) e essas sejam novas descrições destes genótipos em diferentes biovariedades.

Alguns autores já evidenciaram que as amostras de *B. abortus* biovariedade 3 isoladas na Europa se apresentam em um grupo separado da amostra de referência *B. abortus* biovariedade 3 Tulya = ATCC 23450, que se agrupa com isolados da África, demonstrado que *B. abortus* biovariedade 3 é uma biovariedade heterogênia, dividida em subgrupo 3a e 3b (Ocampo-Sosa et al., 2005; Le Flèche et al., 2006). Estes resultados também ocorreram entre as amostras de *B. abortus* biovariedade 3 identificadas no neste trabalho que foram todas classificadas como pertencentes ao subgrupo 3b, diferentemente da amostra de referência da biovariedade 3, que é classificada no subgrupo 3a.

Estes dados podem ser observados na árvore sem raiz (MST) (Fig. 6) onde todas as amostras *B. abortus* biovariedade 3 isoladas estão mais próximas da amostra de referência *B. abortus* biovariedade 6 870 = ATCC 23453 do que da amostra de referência *B. abortus* biovariedade 3 Tulya = ATCC 23450 que não se agrupa com os outros conglomerados descritos. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, que mostra que as amostras de *B. abortus* biovariedade 3 subgrupo3b apresentam um padrão semelhante ao das amostras de *B. abortus* biovariedade 5, *B. abortus* biovariedade 6 e *B. abortus* biovariedade 9 (Ocampo-Sosa et al., 2005).

Curiosamente, três amostras de *B. abortus* biovariedade 3 genótipo 40, isoladas do Estado do Pará, reagiram positivamente na PCR AMOS (Bricker e Halling, 1994), técnica descrita com possibilidade de somente detectar *B. abortus* das biovariedades 1, 2 e 4. Entretanto, ocasionalmente, ocorrem isolados atípicos que não se enquadram nas tabelas e chaves de identificação (Bricker, 2002), e que pode este caso ser mais um exemplo.

A ocorrência de amostras de *Brucella* spp. atípicas tem sido relatadas por alguns

pesquisadores como Banai et al. (1990), que encontraram em duas regiões de Israel amostras de *B. mellitensis* biovariedade 1, sensíveis aos corantes fuccina e tionina, indicando a evolução de uma nova variante. Corbel (1991) também isolou amostras de *B. mellitensis* na Itália, Kuwait, Arábia Saudita, Zimbábue, Índia e na Alemanha sensíveis à tionina (20 µg/mL). Garcia et al. (1988) isolaram amostras atípicas de *B. abortus* de sete rebanhos bovinos infectados em Ontário, Canadá, que eram sensíveis à tionina e à fuccina, semelhantes a *B. abortus* biovariedade 2, mas aglutinavam em soro anti-M, característica de *B. abortus* biovariedade 4.

Quando essas culturas atípicas surgem é necessário estabelecer se este é um fenômeno que se repete, representando um padrão de taxonomia local e não um erro de laboratório. Se comprovada a repetibilidade do evento este pode ser tornar um marcador epidemiológico (Alton, et al., 1988). Bricker (2002) relata que em função do pequeno número de diferenças entre as espécies e as biovariedades de *Brucella* spp., a menor mutação pode resultar em dados conflitantes, dificultando a interpretação da caracterização dos isolados. As três amostras de *B. abortus* biovariedade 3 genótipo 40 reagentes na PCR AMOS foram isoladas em município de Conceição do Araguaia no Estado do Pará em um intervalo de 4 anos entre uma amostra e as outras duas, e estas últimas com um intervalo de 5 meses entre elas, o que pode indicar então que estas amostras atípicas tratar-se de um marcador da região.

Conclusão

A tipagem das amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil, confirmou a presença das biovariedades 1, 2 e 3 de *B. abortus* e revelou a presença de duas biovariedades ainda não descritas no país: *B. abortus* biovariedade 4 e *B. abortus* biovariedade 6;

Todas as amostras biovariedade 3 de *B. abortus* foram identificadas pela PCR

AMOS-ERY-PCR como pertencentes ao sub-grupo 3b;

Três amostras de *B. abortus* biovariedade 3 isoladas no Estado do Pará foram positivas no PCR-AMOS, podendo ser indicativo de um marcador epidemiológico de amostras desse reagião;

A genotipagem das amostras de *B. abortus* isoladas no Brasil demonstrou existência de dois grandes conglomerados: I e II, onde o primeiro agrupou principalmente o genótipo 40 e o segundo o genótipo 28; O MLVA 16 identificou 84 genótipos diferenciados ou ainda não publicados.

O Pannel 2A e 2B do MLVA16 apresentaram um alto grau de diversidade, sendo eficiente na distinção das amostras estudadas e pelo MLVA16 foram classificados 89 genótipos dentre as 137 amostras estudadas, o que permitiu avaliar a distribuição de alguns genótipos, demonstrando sua distribuição entre regiões vizinhas;

A tipagem de isolados brasileiros de *B. abortus*, genotipadas pelo MLVA 16, permitirá a construção de um banco de dados de genótipos de *Brucella* spp. do Brasil, e no futuro da América Latina, que certamente contribuirá para o melhor conhecimento da epidemiologia e controle da brucelose bovina nestes países.

Referências Bibliográficas

- AL DAHOUK S.; TOMASO, H; NÖCKLER, K; NEUBAUER, H; FRANGOULIS, D. Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis – A Review of Literature. Part I ,Techniques for Direct Detection and Identification of *Brucella* sp.p. *Clin. Lab.* v. 49, p.487-505, 2003.
- AL DAHOUK, S., LE FLÈCHE, P., NÖCKLER, K., JACQUES, I., GRAYON, M., SCHOLZ, H. C., TOMASO, H., VERGNAUD, G., NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis, *J. Microbiol. Methods*, v. 69, n. 01, p. 137-145, 2007.
- ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris. 1988., 189 p.
- BAILY, G. G., KRAHN, J. B., DRASAR, B. S., STOCKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg.* v. 95, p. 271-275, 1992.
- BANAI, M., MAYER, I., COHEN, A. Isolation, identification and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J Clin Microbiol*, v.28, n.5, p. 1057-1059, 1990.
- BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No 6 de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jan. 2004, Seção 1, p. 6 – 10. 2001.
- BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet. Microb.* v. 90, p. 433-434, 2002.
- BRICKER, B.J., HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 2660– 2666, 1994.
- 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 Microbiol.*, v. 3, 2003.
- BRICKER, B. J. EWALT, D. R. Evaluations of the HOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC microgiol*, v. 5, n. 37, 2005.

- CLOECKAERT, A., VERGER, J., M., GRAYON, M., GREPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, v. 141, p. 2111-2121, 1995.
- 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 Infect*, v. 5, p. 593-602, 2003.
- CORBEL, M. J. Identification of dyes-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*, v. 29., n. 5, p. 1066-1068, 1991.
- CORBEL, M. J. Epidemiology and prevalence. In: YOUNG, J.E., CORBEL, M. J., *Brucellosis, Clinical and Laboratory Aspects*. CRC Press, 1989, p. 26-37.
- CORBEL, M.J., ELBERG, S.S., COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.
- EMBRAPA, Criação de bovinos de corte no Estado do Pará. Embrapa Amazonia Oriental. Sistema de produção 3. 2006, (<http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/bovinodecorte/pagina/cadeia.html> <acesso em 20 de janeiro de 2009>.
- FOSTER, G. OSTERMAN, B. S., GODFROID, I.J, JACQUES, I., CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Intl J Syst Evolut Microbiol*, v. 57, p. 2688-2693, 2007.
- GARCIA, M. M., BRIAN, B., GERDA, M., RUCKERBAUER, G. M. Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Can. J. Vet. Res.*, v. 52, p. 338-342, 1988.
- GARCIA-CARILLO D.; SZYFRES, B.; GONZALES-TOME, J. Tipificação de brucelas isoladas del hombre y los animales en América Latina. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* v. 14, p. 117- 125, 1972.
- GARCÍA-YOLDI, D., MARÍN, C. M., LÓPEZ-GOÑI, I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol Lett*, v. 245, p. 79-84, 2005.
- GARCÍA-YOLDI, D., LEFLÈCHE, P., MARÍN, C. M., DE MIGUEL, M. J., MUNOZ, P.M., VERGNAUD, G., LOPEZ-GOÑI, I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Vaccine*, v.25, p. 2858-2862, 2007
- GARIN-BASTUJI, B. Brucellosis bovine, ovine et caprine: Contrôle et prevention. *Le point Veterinaire*, v. 25, n. 152, p. 107-114, 1993.
- GIORGI, W., PESTANA DE CASTRO, A.F., PORTUGAL, M. A. S. C. Tipificação de amostras de *Brucella* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol.* v. 3, n. 1, p. 39-44. 1972.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003 p.191-195.
- HUNTER, P.R., GASTON, M.A., Numeric Index of the discriminatory ability of typing systems: na application of Simpson's Index of Diversity. *J Cli Microbiol.* v. 26, n. 11, p. 2465- 2466. 1988.
- ICA, T., AYDIN, F., ERDENLIG, L., GULER, L., BÜYÜKCANGAZ, E. Characterisation of *Brucella abortus* biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b. *Vet Rec*, v. 163, p. 659-661. 2008.

- LAGE, A.P., POESTER, F.P., GONÇALVES, V.S.P., ROXO, E., MÜLLER, E.E., CAVALLÉRO, J.C.M., FERREIRANETO, J.S., MOTTA, P.M.P.C., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO J.R. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. *Cad. Tec Vet., Zootec*, n.47, p.99-110, 2005.
- LANGENEGGER, J.; SCHECCHIN, H.; BAPTISTA, A.M. Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.10, p. 45-49; 1975.
- LANGONI, H., ICHIHARA, S. M., SILVA, A. V., PARDO, R. B., TONIN, F. B., MENDONÇA, L. J. P., MACHADO, J. A. D. Isolation of *Brucella* spp from Milk of Brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais States, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 37, n. 6, p. 444 - 448, 2000.
- LE FLECHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON P., DENOEUDE, F., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A., VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat *Loci* for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, v. 6, n. 9, 2006.
- LUNA-MARTÍNEZ, J. E., MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet microbiol*, v. 90, p. 19-30, 2002.
- LUCERO N. E., AYALA, S. M., ESCOBAR, G. I., JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect*, v. 136, p. 496-503, 2008.
- Mac FADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301 p.
- MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>), <acessado em 31 de janeiro de 2009>.
- MARIANELLI, C., GRAZIANI, C., SANTANGELO, C., XIBILIA, M. T., IMBRIANI, A., AMATO, R., NERI, D., CUCCIA, M., RINNONE, S., DI MARCO, V. D., CIUCHINI, F. Molecular Epidemiological and Antibiotic Susceptibility Characterization of *Brucella* Isolates from Humans in Sicily, Italy. *J Clin Microbiol*, set. , p. 2923–2928, 2007.
- MEGID, J., ALBERT, D., FAGLIARI, A.C., PAES, A.C., LISTONIS, 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 Brazil., *Vet Rec*, v. 158, n. 29, pg. 147-148, 2005.
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 5 ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008, p. 328 – 345.
- OCAMPO-SOSA, A. A., BALBÍN, J.A., GARCIA-LOBO, J.M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol*, v. 110, p. 41-51, 2005.
- OSTERMAN B., MORYIÓN, I. Internacional Committee on Systematics of Procarotes, Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*, Minutes of the meeting, 17 September, 2003, Pamplona, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 56, p. 1173-1175, 2006.
- PITCHER, D. G., N. A. SAUNDERS, AND R. J. OWEN. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* v.8, p.151–156, 1989.
- POESTER, F.P, GONÇALVES, V.S.P., LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*, v. 90, p.55-62, 2002.
- POESTER, F. P. SAMARTINO, L. E. LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec*, n.47, p.13-29, 2005.

- RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) Brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.11-18, 2002.
- RENUKARADHYA, G. J., ISLOOR, S., RAJASEKHAR, M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/ eradication of brucellosis in India. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.183-195, 2002.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 Ed. Plymouth: CSHL Press, 2001. 2344 p.
- SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDES, R.; COSTA, G.M.; MARTINS, N.E. Detecção de *Brucella abortus* (muestra B19) por el complejo inmunoenzimático avidinabiotina- peroxidasa em el testículo y em el epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Arch Reprod Anim*, n. 6, p. 34-41, 1998.
- SILVA, F.L., PAIXÃO, T.A., BORGES, A.M., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Brucelose Bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.1-12, 2005.
- SCHOLZ, H.C., HUBALEK, Z., SEDLÁČEK, I., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., MELZER, F., KÄMPFER, P., NEUBAUER, H., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, S., WHATMORE, A. M., FALSÉN, E., BAHN, P., GÖLLNER, C., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H.J., NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, p.375-382, 2008.
- STRUELENS, M. J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect*, v. 2, p.:2-11, 1996.
- VERCESI FILHO A.E., CARVALHO FARIA, F.G. MADALENA, F.E. Estrutura populacional do rebanho indubrasil registrado no Brasil. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, v. 10, n.2., p. 86-92. 2002.
- VERGER, J. M., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 35, p. 292–295, 1985.
- 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 of tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* v. 44, p. 1982–1993, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle e posterior erradicação da brucelose bovina beneficiam o ciclo produtivo da pecuária bovina, além de aumentar a credibilidade da qualidade do produto final, gerando maior aceitação pelos consumidores do mercado interno e externo e incrementando a lucratividade da pecuária bovina brasileira. Além disso, resguarda a saúde pública, principalmente dos profissionais ligados a bovinocultura, como médicos veterinários, produtores rurais, vaqueiros e trabalhadores de frigoríficos.

O isolamento e identificação de *B. abortus* é importante na caracterização epidemiológica da doença, porém é um processo demorado e a sensibilidade da técnica depende do número de células viáveis e o tipo de tecido enviado para o diagnóstico laboratorial.

Nosso trabalho demonstrou que a utilização do caldo triptose suplementado com o antimicrobiano de Farrell foi eficiente como meio de enriquecimento para isolar e identificar a *B. abortus*, e de grande utilidade para isolamento de *Brucella* spp. de materiais suspeitos coletados em abatedouros.

A tipagem das amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos no Brasil revelou a

presença de dois biovars que ainda não haviam sido previamente publicados, as biovariedades 4 e 6.

A genotipagem das amostras, por sua vez demonstrou haver dois grandes grupos com grau de similaridade próxima de 52%, agrupando principalmente as amostras do genótipo 28 e outro as amostras do genótipo 40.

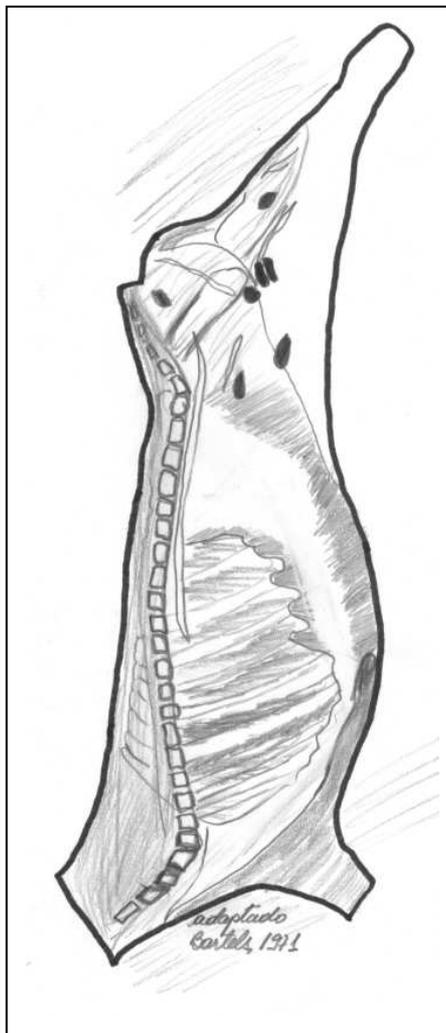
O Painel 2A e 2B do MLVA16 foi muito importante para caracterizar a distribuição de alguns genótipos, demonstrando que sua principal forma de distribuição está entre regiões vizinhas, e com maior intercâmbio comercial de gado, além disso, revelaram perfis genotípicos diferenciados ou ainda não publicados das amostras genotipadas de outros continentes.

Assim acreditamos que este trabalho contribuiu efetivamente na exploração dos biovariedades circulantes no país, bem como do perfil genotípico, e que o conjunto de amostras aqui genotipadas será de grande valor para a construção de um banco de dados de genótipos de *Brucella* spp. do Brasil e, no futuro, da América Latina, além de fornecer uma idéia da distribuição dos genótipos de isolados brasileiros de *B. abortus* nos Estados estudados.

ANEXOS

ANEXO 01- Instruções para coleta, conservação e remessa de material para diagnóstico bacteriológico de brucelose bovina.

- 1- As lesões devem ser coletadas durante o abate junto as linhas de inspeção;
- 2- Coletar linfonodos ilíaco interno¹, inguinais² no caso dos machos e supra-mamários³ em fêmeas de animais sabidamente positivos ou de lesões suspeitas detectadas na linha de inspeção;
- 3- Deve ser coletada a peça inteira, quando possível, evitando resíduos como sangue, fezes e urina, etc. As peças de um animal poderão ser armazenadas no mesmo pote plástico;
- 4- Identificar o pote com o número da GTA e município de emissão da GTA, se possível em vários locais do frasco como na etiqueta, tampa e lateral. (Segue caneta tipo marcador permanente junto com este protocolo);
- 5- Em seguida os potes deverão ser embalados individualmente em sacos plásticos e lacrados com o lacre numerado.
- 6- Deve ser preenchida a planilha de identificação, em duas vias. A primeira via deverá seguir junto com o material, discriminando os dados solicitados, e a segunda via deve permanecer no arquivo do SIF;
- 7- O material deverá ser congelado (-20°C) para, em momento oportuno, ser encaminhado congelado a Escola de Veterinária\UFMG (etiqueta anexa).
- 8- Os potes e sacos plásticos devem estar limpos e secos;
- 9- Lembra-se que o material deverá chegar ao destino ainda congelado e em bom estado de conservação. Em caso de qualquer dúvida favor entrar em contato com um dos telefones abaixo ou via correio eletrônico.



**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Laboratório de Bacteriologia Aplicada**

A/C Prof. Andrey Pereira Lage

Av. Antônio Carlos, 6627. CP 567
Cep 30123-970 – Belo Horizonte-MG

ANEXO 2- Características de espécies e biovariedade do gênero *Brucella* sp.

Biotipo	Requer CO ₂	Produz H ₂ S	Cromobacteriostase ^{a 1}		Aglutinação em			
			Fucsina básica	Tionina		Soro mono Especifico ²		Soro anti-rugosa
				a	b	A	M	
<i>Brucella melitensis</i>								
1	-	-	+	-	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	+	-	-
3	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Brucella abortus</i>								
1	d	+	+	-	-	+	-	-
2	d	+	-	-	-	+	-	-
3	d	+	+	+	+	+	-	-
4	d	+	+	-	-	-	+	-
5	-	-	+	-	+	-	+	-
6	-	d	+	-	+	+	-	-
7	-	d	+	-	+	+	+	-
9	- ou +	+	+	-	+	-	+	-
<i>Brucella suis</i>								
1	-	+	-	+	+	+	-	-
2	-	-	-	-	+	+	-	-
3	-	-	+	+	+	+	-	-
4	-	-	+	+	+	+	+	-
5	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Brucella neo tomæ</i>								
	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Brucella ovis</i>								
	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Brucella canis</i>								
	-	-	-	+	+	-	-	+

Fonte: Alton et al., 1988; OIE, 2008

^a Certificado coloração na concentração a = 1:25.000; b = 1 : 50.000;

d- normalmente positiva no isolamento primário

¹- Cromobacteriostase- É a semeadura em meio sólido (ágar-triptose ou ágar-fígado) de *Brucella* sp adicionado de concentrações adequadas de tionina e de fucsina básica;

²- Aglutinação com soros monoespecíficos: Trata-se da utilização de soros monoespecíficos anti-*abortus* (anti-A) e anti-*melitensis* (M);

ANEXO 3- Tabela dos resultados do número de repetições de cada *locus* do MLVA16.

Amostra	G ¹	B ²	O ³	Locus															
				6	8	11	12	42	43	45	55	4	7	9	16	18	19	21	30
A1	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	9	4	3	3	7	24	8	4
A4	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	9	4	3	3	7	24	8	8
A6	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	9	4	7	3	7	23	8	3
30	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
32	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	5	4	7	22	8	5
33	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
34	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
35	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	23	8	5
36	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	23	8	5
37	40	Ba6	MG	3	5	3	12	2	2	3	3	9	4	3	3	7	22	8	4
38	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	22	8	5
39	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
40	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
42	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	4
43	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	4
44	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	4
45	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	7	4	3	4	7	23	8	3
46	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	4
47	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	4
49	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	6	6	23	7	5
50	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	23	7	4
54	28	Ba2	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	23	7	5
55	28	Ba2	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	6	23	7	5
61	40	Ba6	MG	3	5	3	12	2	2	3	3	7	4	3	3	7	23	7	3
62	40	Ba3	MG	3	5	3	12	2	2	3	3	7	4	3	3	7	22	8	3
66	40	Ba3	MG	3	5	3	12	2	2	3	3	9	4	3	3	7	22	8	3
70	40	Ba6	MG	3	5	3	12	2	2	3	3	8	6	3	3	7	22	8	3
95	I	Ba6	TO	4	5	3	11	2	2	6	3	8	5	4	8	4	20	10	4
96	28	Ba1	TO	4	5	4	12	2	2	3	3	5	6	3	3	6	22	8	5
136	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	3	6	22	8	5
137	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	6	3	3	6	22	8	5
138	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	3	6	23	8	5
144	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	3	6	23	8	6
147	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	6	3	3	6	23	8	5
161	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	4	4	3	3	7	23	8	3
162	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	8	4	3	3	7	23	8	3
163	II	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	1	7	4	3	3	7	23	8	3
164	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	10	4	3	3	7	23	8	3
165	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	23	8	3
166	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	5	4	3	3	7	22	8	3
167	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	12	4	3	3	7	22	8	3
168	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	5	4	3	3	7	22	8	3
169	40	Ba6	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	7	4	3	3	7	22	8	3
170	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	7	4	3	3	7	22	8	3
172	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	6	4	3	3	7	22	8	3
173	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	6	4	3	3	7	22	8	3
174	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	5	4	3	3	7	22	8	3
175	33	Ba1	PA	3	5	4	12	2	2	3	3	5	4	3	8	6	22	8	7
181	28	Ba2	TO	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	9	5
182	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	9	3
187	40	Ba1	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	9	3
188	40	Ba1	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	9	3
189	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	4	4	3	3	7	22	9	3
190	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	9	3

Continuação...

Amostra	G ¹	B ²	O ³	Locus															
				6	8	11	12	42	43	45	55	4	7	9	16	18	19	21	30
192	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	9	3
194	28	Ba1	PA	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	3	6	22	8	7
195	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	5	4	3	4	7	22	8	3
196	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	5	2	3	4	7	22	8	3
198	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	4	7	22	8	3
199	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	4	7	22	8	3
200	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	14	4	3	4	7	22	8	3
201	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	4	4	3	4	7	22	8	3
202	28	Ba1	TO	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	3	6	22	9	7
203	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	5	4	3	8	9	22	3	3
205	28	Ba1	PA	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	8	8
206	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	8	3
207	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	6	4	3	3	7	22	8	3
208	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	6	4	3	3	7	22	8	3
209	33	Ba2	PA	3	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	8	6
211	40	Ba3	TO	3	5	3	12	2	2	3	3	14	4	3	3	7	22	8	3
216	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	14	4	3	3	7	22	8	3
217	III	Ba3	PA	4	4	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	22	8	3
218	40	Ba6	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	13	4	3	3	7	23	8	3
219	40	Ba3	PA	3	5	3	12	2	2	3	3	4	4	3	3	7	22	8	3
223	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
224	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
01/06	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
02/06	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	9	4	6	22	8	5
03/06	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	6	22	8	5
07/06	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	6	22	8	5
10/06	IV	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	4	3	4	5	3	3	6	22	9	5
11/06	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	12	5	6	22	8	4
13/03	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	8	7
13a/02	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	23	9	6
13b/02	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	22	8	6
14/03	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	6	22	8	5
15/03	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	9	7
16/02	32	Ba4	RS	4	5	4	12	1	2	3	3	1	4	3	4	6	23	8	6
17a/02	40	Ba6	RS	3	5	3	12	2	2	3	3	7	5	3	3	7	22	9	3
17b/02	40	Ba6	RS	3	5	3	12	2	2	3	3	7	5	3	3	7	22	8	3
80/04	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	4	6	22	8	5
89/04	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	4	6	22	9	5
477	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	5	22	8	6
577	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	5	22	8	6
Ba 56	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	22	8	7
Ba96	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	7

Continuação...

Amostra	G ¹	B ²	O ³	Locus															
				6	8	11	12	42	43	45	55	4	7	9	16	18	19	21	30
RS 1	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	6	22	8	7
RS 3	28	Ba1	RS	3	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	3	6	22	8	5
RS 4	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	4	6	22	8	5
RS 5	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	5	22	8	5
RS 6	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	9	4
RS 7	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	4	6	22	9	6
RS 8	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	6	6	22	8	5
RS 9	28	Ba1	RS	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	6	6	22	9	4
RS 10	28	Ba1	RS	4	5	4	11	2	2	3	3	4	5	3	5	6	22	9	5
Ba 1	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	5	7	22	8	5
Ba 2	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	6	6	22	8	5
Ba 3	40	Ba6	SP	3	5	3	12	2	2	3	3	8	4	3	3	6	22	8	3
Ba 4	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	6	6	22	8	5
Ba 5	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	6
Ba 6	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	3	6	22	8	6
Ba 7	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
Ba 8	28	Ba1	SP	4	5	3	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	6
Ba 9	V	Ba1	SP	4	5	4	13	2	2	3	3	3	4	3	6	6	22	8	6
Ba 10	V	Ba1	SP	4	5	4	13	2	2	3	3	3	4	3	6	6	22	8	5
BOTC	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
GM	28	Ba1	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
Pintad	28	Ba1	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
Paráí	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	6
Bawla	28	Ba1	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
1.1	28	Ba1	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	8
5.1	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
5.2	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	5
5.3	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	6
6.1	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	7
388-01	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
147-6	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	5
393-11	28	Ba1	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	6
Flor 5.1	28	Ba2	MG	4	5	4	12	2	2	3	3	3	4	3	4	6	22	8	6
SC1	28	Ba1	SC	4	6	4	12	2	2	3	3	3	4	3	5	6	22	8	7
SC2	28	Ba2	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	9	6
SC3	28	Ba1	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	9	6	22	9	5
SC4	28	Ba2	SC	4	5	4	12	2	2	3	3	4	4	3	5	6	22	9	7
J 20	28	Ba1	SP	4	5	4	12	2	2	3	3	4	5	3	4	6	22	9	5
J 31	40	Ba3	SP	3	5	3	12	2	2	3	3	8	4	3	3	7	22	9	4
J 24	40	Ba6	SP	3	5	3	12	2	2	3	3	8	4	3	3	7	22	9	3
J 05	33	Ba1	SP	3	5	4	12	2	2	3	3	8	4	3	3	7	22	9	3
Ba544	28	Ba1	REF	4	5	4	12	2	2	3	3	3	5	3	4	5	21	8	5
Ba86/	29	Ba2	REF	4	5	4	12	2	1	3	3	3	4	3	3	6	21	8	5

Continuação...

Amostra	G ¹	B ²	O ³	Locus															
				6	8	11	12	42	43	45	55	4	7	9	16	18	19	21	30
Tulya	34	Ba3	REF	3	5	4	11	2	2	3	3	6	5	3	11	8	20	8	5
C292	30	Ba4	REF	4	5	4	12	2	2	2	3	3	4	3	3	6	21	8	5
B3196	39	Ba5	REF	3	5	3	12	2	2	2	3	6	7	3	3	7	21	8	3
870	40	Ba6	REF	3	5	3	12	2	2	3	3	3	6	6	6	7	21	8	3
C68	39	Ba9	REF	3	5	3	12	2	2	2	3	6	6	3	3	7	21	8	3
16M	47	Bm1	REF	3	4	2	13	4	2	3	3	2	5	8	3	5	21	6	6
63/9	45	Bm2	REF	1	5	3	12	2	2	3	2	7	4	3	5	4	20	8	4
Ether	51	Bm3	REF	3	5	3	13	1	1	3	3	-	5	12	10	7	21	8	3
63/290	1	Bo	REF	3	5	2	10	1	1	5	2	6	7	7	6	3	4	9	2
1330	6	Bs1	REF	2	3	6	10	4	1	5	2	6	6	5	5	4	19	9	3

- 1 - G- Genótipo Painel 1
- 2 - B – Biotipagem
- 3 - O – local de origem das amostras