

ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO GENE *virB5* NA DETECÇÃO DE *Brucella* spp. POR PCR EM SANGUE DE BOVINOS

Bruna Barbosa¹; Carina Elisei²; Cleber Oliveira Soares²; Cristiane Camargo Sanches³
Irene Elisei Novaes Lauria³; Renata Bastos³; Grácia Maria Soares Rosinha²

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande/MS. bru.barbosa@hotmail.com

²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande/MS.

RESUMO

A brucelose bovina é uma zoonose de grande importância em sanidade animal e saúde pública, sendo causada por bactérias Gram-negativas, intracelular facultativas do gênero *Brucella*. Esta enfermidade é responsável por problemas sanitários e econômicos, particularmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne, onde a sua incidência é alta. Foi caracterizado em bactérias intracelulares o sistema de secreção tipo IV (VirB) responsável pelo transporte de moléculas efetoras e relacionado com fatores de virulência de *Brucella*. O operon *virB*, responsável pela síntese de proteínas que potencializam sua virulência, possui uma região denominada *virB5*, altamente conservada entre as espécies de *Brucella*. Objetivou-se neste estudo analisar a sensibilidade e especificidade do gene *virB5*. Para tanto foram analisadas amostras de sangue e de cultura de 13 bovinos provenientes de frigoríficos. Em seguida, foi realizado a extração do DNA genômico e este amplificado pela técnica de PCR utilizando um par de *primer* para o gene *virB5*. Como controle da especificidade do gene foram utilizadas 3 espécies de microorganismos. Das 13 amostras provenientes de cultura 12 amplificaram o fragmento de 514 pb do gene *virB5*, confirmando a presença de *Brucella* spp. nestas amostras. Porém das 13 amostras provenientes de sangue, somente 9 amplificaram a região específica para este gene. Das 3 espécies testadas como controle, uma amplificou o fragmento de 514 pb, apresentando uma reação cruzada. Desta forma foi possível observar que o gene *virB5* apresentou-se mais sensível para amostras de culturas, comparado com as amostras de sangue, entretanto pouco específico quando testado com outras espécies.

Palavras-chave: Brucelose bovina; operon *virB*; T4SS.

ABSTRACT

Bovine brucellosis is a zoonosis of great importance in animal and public health, caused by gram-negative intracellular facultative genus *Brucella*. This disease is responsible for health and economic problems, particularly in the tropics and countries with little investment in production of milk and meat where its incidence is high. He was featured in bacteria intracellular system of type IV secretion (*virB*) responsible for transport of effector molecules and is associated with virulence factors *Brucella*. The *virB* operon, responsible for the synthesis of proteins that potentiate its virulence, has a region called *virB5*, highly conserved among species of *Brucella*. The objective of this study analyzing the sensitivity and specificity of gene *virB5*. To Therefore, we analyzed blood samples and culture of 13 cattle from refrigerators. Then the gene was amplified *virB5* through PCR. As control of specificity of the gene were used three species of microorganisms. Of the 13 samples from Culture 12 amplified fragment of 514 bp gene *virB5*, confirming the presence of *Brucella* spp. these samples. But the 13 samples the presence of *Brucella* spp. these samples. But the 13 samples this gene. Of the three species used as a control, an amplified fragment of 514 bp, showing a cross-reaction. Thus was observed that the gene *virB5* was more sensitive to culture samples, compared with blood samples, however not very specific when tested with other species.

Keywords: Bovine brucellosis; operon *virB*; T4SS.

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma zoonose causada por bactérias intracelular facultativas do gênero *Brucella*, que pode infectar o homem e os animais domésticos e silvestres (NICOLETTI, 1989).

Durante as últimas décadas, taxonomistas desenvolveram um sistema de classificação baseado principalmente nas diferenças em patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas. A comum associação entre patógeno-hospedeiro possibilita a classificação das espécies de *Brucella* da seguinte forma: *B. melitensis* em caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos); *B. abortus* em bovinos (bubalinos, cervídeos, canídeos e seres humanos); *B. ovis* em ovinos; *B. suis* em (suínos e bovinos); *B. neotomae* em ratos do deserto, *B. canis* em canídeos (seres humanos) (CORBEL; BRINLEY-MORGAN 1984), *B. ceti* (golfinhos e baleias), *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos) (FOSTER et al., 2007) e *B. microti* em ratos do deserto. Recentemente foi descrita uma nova espécie de *Brucella* denominada de *B. inopinata* isolada de um paciente com sinais clínicos de brucelose (SCHOLZ et al., 2008).

Estas bactérias acometem uma larga escala de hospedeiros. A brucelose que comumente acomete os bovinos está associada, especificamente, com *Brucella abortus* biovar 1, em 85% dos casos relatados (NICOLETTI, 1980). Em humanos, a brucelose provoca febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, já em animais domésticos os órgãos reprodutivos são principalmente afetados, causando aborto e infertilidade (YOUNG, 1983; YOUNG, 1988).

Além dos problemas causados à saúde pública, a brucelose também gera prejuízos econômicos ao tornar os produtos da carne e leite vulneráveis às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Sendo assim, alguns países adotaram medidas para erradicação da brucelose ou diminuição da sua ocorrência através de métodos de diagnóstico confiáveis, de fácil e rápida execução, além de recursos para sua realização.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconheceu a necessidade de definir uma estratégia de controle da brucelose e da tuberculose e, a partir de 2001, foi instituído o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT).

O sucesso de um programa de controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. A sensibilidade e a especificidade são critérios relevantes para a escolha do teste (CHAPPEL, 1989), onde a sensibilidade é a habilidade de um teste em identificar um animal infectado, e a especificidade é a habilidade para designar seguramente os animais não infectados pelo agente em questão (HUBER; NICOLETTI, 1986).

Os métodos de diagnósticos para a detecção da brucelose são divididos em métodos indiretos que visam demonstrar a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e sêmen (ACHA; SZYFRES, 1986; BRASIL, 2004; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003) e pela identificação do agente por métodos diretos com isolamento e cultura do agente, entretanto essa técnica requer no mínimo uma semana para obtenção de dados (OIE, 2004).

Atualmente, a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido muito utilizada para a identificação de *Brucella* spp., através da detecção do DNA genômico, por ser um teste rápido e que apresenta alta sensibilidade e especificidade com menor risco de contaminação (EWALT; BRICKER, 2000; ERLICH *et al.*, 1991).

O gene *virB5* é um marcador utilizado para identificação de *Brucella* spp. este gene está inserido no operon *virB*, que juntamente com outros genes, faz parte do sistema de secreção do tipo IV (T4SS). Segundo Lapaque e colaboradores (2005) os principais fatores de virulência já descritos em *B. abortus* são o T4SS e o lipopolissacarídeo (LPS). Este tipo de sistema foi identificado em *Brucella* spp. e está sendo investigado com muito interesse, pois apresenta um papel relevante no

transporte de fatores de virulência e na capacidade de sobrevivência e multiplicação intracelular (BARON *et al.*, 2002; MORENO; CLOECKAERT; MORIYÓN, 2002).

Sendo o *virB5* um gene presente no genoma de todas as espécies de *Brucella*, objetivou-se neste trabalho analisar sensibilidade e especificidade de uma reação de PCR utilizando um par de primer que amplifica um fragmento correspondente ao gene *virB5*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram obtidas 13 amostras (pulmão, fígado, músculo, linfonodo, ligamento cervical e sangue) de bovinos provenientes de frigoríficos de Campo Grande - Mato Grosso do Sul, que apresentavam lesões características de brucelose.

Estas amostras foram submetidas à cultura em meio *Tryptic Soy Tooltip Agar* (TSA) e o meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB) após o crescimento das colônias, foi realizada a extração do DNA genômico. Dos 13 animais com lesões características de brucelose, apenas um não apresentou cultura positiva, mas mesmo assim foi realizada a extração de DNA do cultivo em meio líquido. As amostras de DNA foram previamente amplificadas utilizando o par de *primer* que codifica a proteína BCSP31. (O processamento destas amostras foi realizado no laboratório de Bacteriologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais e cedida gentilmente pela Msc. Cristiane Carmago Sanches).

Extração de DNA genômico das amostras de sangue

Para a extração, foram utilizados 350 μ L de amostras de sangue. Acrescentou-se 500 μ L de SDS (Dodecil Sufato de Sódio) 20% e a amostra foi homogeneizada por vórtex e incubada a 65°C por 1 hora. Foi adicionado 800 μ L de clorofórmio e agitado vigorosamente em vortex, em seguida foi adicionado 350 μ L da solução de precipitação protéica (3M C₂H₃KO₂, 2M CH₃COOH) e homogeneizado novamente. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm/15 min. O sobrenadante foi coletado e tratado com 1mL de etanol P.A. gelado e homogeneizado por inversão até formar um precipitado e após o material foi armazenado à -20°C overnight. Na etapa seguinte foi centrifugado à 13000 rpm/5 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento formado foi adicionado 1mL de etanol 70%. Logo após, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm/2 min e o sobrenadante descartado. O pellet secou a temperatura ambiente e foi ressuspendido em 100 μ L de água milli-Q e incubado à 65°C por 5 minutos. Adicionou-se 1 μ L de solução de RNase (20 ng/ μ L) e incubou à 37°C por 30 minutos. Posteriormente o DNA foi estocado a -20°C. A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram avaliados

em espectrofotômetro (Gene Quant®, Amersham Pharmacia, EUA), sob absorvância de 280 m, concentrados à 100 ng/μL cada amostra e por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Sybr Gold ® (Invitrogen) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

Escolha do gene

A escolha do gene foi baseada numa busca na literatura balizada em estudos de espécies de *Brucella*. O gene *virB 5* é um dos genes que faz parte do operon *virB*, que esta presente em várias espécies de *Brucella*, este gene mostrou-se essencial para a virulência de *B. abortus* em camundongos e necessário para a persistência desta bactéria em órgãos deste modelo animal (Hanting *et al.* 2008).

O gene *bcs31* tem sido utilizado para a detecção de várias espécie de *Brucella*, por meio da PCR. Estudos têm demonstrado que este gene apresenta um alto grau de conservação, o qual suporta um estudo mais aprofundado da proteína de 31 kDa para exploração de seu potencial como uma vacina ou um componente de diagnóstico, (Da Costa, 1996).

Amplificação do gene *virB5* pela técnica de PCR

Para a amplificação do gene *virB5* de *Brucella abortus* pela técnica de PCR foram utilizados um par de *primer* F(5' TAC GAA GCG GTC ATG ACG G '3) e R(5' GTG TAG ATG ATG TGT TGC GTG '3) citados em Hartigh *et al.* (2004), para uma região conservada do gene, que amplifica um produto de aproximadamente 514 pares de bases (pb) correspondente a posição 5063 a 5549 no genoma de *B. abortus*, no de acesso AF226278, no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

O ciclo de temperaturas empregado procedeu-se de desnaturação 95°C por 3 minutos e, ao final, extensão de 72°C por 10 minutos. Foram empregados 35 ciclos divididos em três fases: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Estes parâmetros foram selecionados depois de várias tentativas para otimizar as condições de rigor adequado (conforme determinado pela ausência de bandas inespecíficas indesejadas) e um melhor rendimento do produto amplificado.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 μl. Cada reação contendo 100 ng de DNA, 0,03 mM MgCl₂, 0,25 pMol primer, 0,3 mM DNTP`s e 1,5 U de taq DNA polimerase.

A análise do produto amplificado das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, sendo as amostras de sangue coradas com Sybr Gold ® (Invitrogen) e as amostras de cultura coradas com Brometo de etídio (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador e fotografadas usando máquina fotográfica digital interligada ao sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentatation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

Para analisar a especificidade do primer *virB5*, foram feitas PCRs utilizando DNA da cepa selvagem 2308 de *B. abortus*, juntamente com DNA de outras espécies de microorganismos como: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Anaplasma marginale* e *Campylobacter spp.*. Como controle negativo utilizou-se DNA de um bovino negativo para brucelose e outro controle negativo sem a presença do DNA molde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento gênico correspondente à região codificante do gene *virB5* amplificado por PCR, a partir do DNA genômico de amostras de sangue (figura 1) e de cultura (figura 2) de *Brucella spp.*, apresentou um amplicon de aproximadamente 514 pb, que compreende uma região conservada do gene *virB5*.

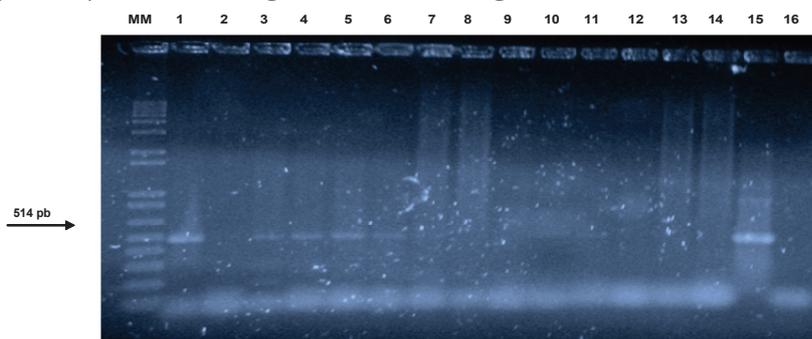


Figura 1. Análise do produto da amplificação de material de sangue por PCR da região conservada do gene *virB5*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % em Sybr Gold® (Invitrogen), mostrando nas canaletas 1-13 produto da amplificação do gene *virB5* nas amostras de sangue. A canaleta 14 correspondente ao DNA de bovino negativo para brucelose. A canaleta 15 corresponde ao controle positivo da PCR, com a amostra selvagem 2308. A canaleta 16 corresponde ao controle negativo da PCR, onde não foi adicionado DNA. Marcador molecular (MM) perfil eletroforético do padrão de pares de bases 1 kb DNA Plus (Invitrogen).

A PCR realizada com as 13 amostras de DNA genômico extraído de sangue, apenas nove (69%) amplificaram. Já das 12 amostras de DNA genômico extraído de cultura, todas (100%) amplificaram, e a amostra que não houve crescimento na cultura manteve-se negativa (Tabela 2).

A diferença observada entre o número de animais positivos na PCR utilizando DNA sanguíneo e o de cultura, não foi significativo devido ao pequeno número amostral.

A baixa sensibilidade da reação utilizando DNA sanguíneo pode estar relacionada a vários fatores: 1- bacteremia circulante insuficiente; 2- inibição, causada por falhas nas condições de amplificação, como a falta de uniformidade de temperatura no termociclador; 3- qualidade do DNA extraído, sabe-se que compostos fenólicos podem impedir a ligação da Taq polimerase ao DNA ou degradar a enzima (WILSON, 1997).

O mecanismo de ação desses inibidores ainda não é suficientemente compreendido. A inibição pode ser parcial, reduzindo a sensibilidade de detecção, ou, em alguns casos, total, sendo um dos problemas mais comuns de falso negativo.

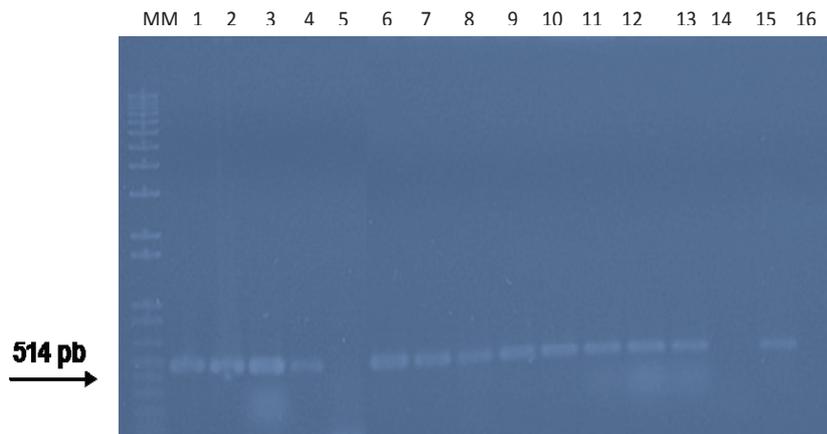


Figura 2. Análise do produto da amplificação de material de cultura por PCR da região conservada do gene *virB5*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio, mostrando nas canaletas 1-13 produto da amplificação do gene *virB5* nas amostras de cultura. A canaleta 14 correspondente ao DNA de bovino negativo para brucelose. A canaleta 15 corresponde ao controle positivo da PCR, com a amostra selvagem 2308. A canaleta 16 corresponde ao controle negativo da PCR, onde não foi adicionado DNA. Marcador molecular(MM) mostra o perfil eletroforético do padrão de pares de bases 1 kb DNA Plus (Invitrogen).

Considerando o isolamento como teste padrão, a PCR com os primers específicos para o gene *virB5* mostrou-se sensível e eficiente nas amostras cultivadas, apresentando resultado 100% compatível com a cultura.

Para controle da especificidade da reação, o mesmo ensaio foi realizado com as bactérias *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Anaplasma marginale* e *Campylobacter spp.* (Figura 3). O fragmento de 514 pb amplificado pelos primers específicos para o gene *virB5* foi observado em *C. pseudotuberculosis*, apesar do operon *virB* não estar presente em nesta bactéria. O *primer F* apresentou identidade de 100% com 12 a 8 bases de varias proteínas desta bactéria com número de acesso (GP 001829) no GenBank. , o mesmo foi observado para o *primer R*.

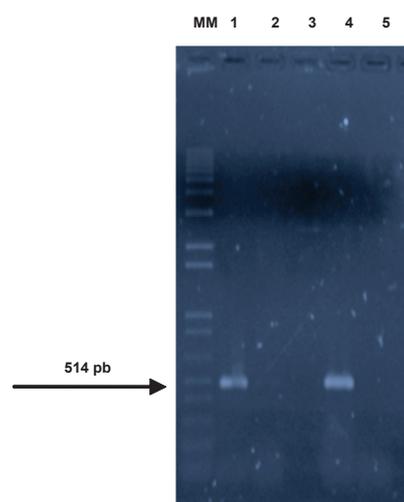


Figura 3. Análise do produto da amplificação de diferentes espécies de microorganismos por PCR da sequência da região conservada do gene *virB5*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 1 o produto da amplificação do gene *virB5* na amostra de *C. pseudotuberculosis*. Nas canaletas 2 e 3 observa-se a não amplificação do gene *virB5* nas amostras de *A. marginale* e *Campylobacter spp.*, respectivamente. A canaleta 4 mostra a amplificação na cepa selvagem 2308 de *B. abortus*. A canaleta 5 corresponde ao controle negativo da PCR, onde não foi adicionado DNA. Marcador molecular(MM) mostra o perfil eletroforético do padrão de pares de bases 1 kb DNA Plus (Invitrogen).

Na Tabela 1 há uma comparação entre os resultados das PCR's feitas com os *primers* para amplificação do gene *virB5* e o gene *bcs31* das amostras de cultura, utilizando a cultura (isolamento) como controle positivo (teste ouro). Neste resultado pode-se observar que a PCR utilizando o gene *bcs31* não apresentou concordância com a cultura (isolamento) resultando em um animal falso-positivo e outro falso-negativo.

Tabela 1- Comparação dos resultados de cultura e das PCR's

Amostra	PCR			
	Cultura	<i>bcs</i> p31	<i>vir</i> B5	
	Isolamento	Isolados	Isolados	Sangue
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
6	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
9	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
13	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

No aspecto especificidade, o gene *virB5* não foi compatível com o esperado, amplificando o produto de 514 pb em *C. pseudotuberculosis*, mostrando não ser específico para *Brucella spp.*

Devido ao baixo número de amostras utilizadas neste trabalho, não foi possível utilizar os cálculos para apresentar os resultados de sensibilidade e especificidade da PCR utilizando o gene *virB5* em porcentagem.

CONCLUSÕES

O gene *virB5* apresentou uma boa sensibilidade quando utilizado em amostras de isolamento, mostrando-se totalmente compatível com a cultura, que são as amostras padrão. Entretanto, para amostras de DNA extraídas a partir de sangue, a sensibilidade destes *primers* foi baixa, provavelmente devido a baixa bacteremia na corrente sanguínea dos animais negativos para a PCR.

Os resultados obtidos sugerem que o gene *virB5*, embora altamente conservado em espécies de *Brucella*, não é específico de *Brucella spp.*, e portanto, não apresenta-se ideal para o diagnóstico de brucelose bovina.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Gado de Corte pelo apoio financeiro. À Dra. Grácia Maria Soares Rosinha e Dra. Carina Elisei pela ajuda na execução do trabalho, e a doutoranda Cristiane Sanches pelo material cedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986.

BARON, R. M. et al. "DNA sequence variants in epithelium-specific ETS-2 and ETS-3 are not associated with asthma." **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 7, n. 166, p. 927-32, 2002.

BRASIL, Instrução Normativa DAS nº 06 de 8 de janeiro de 2004. **Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 22 novembro de 2010.

CORBEL, M.J.; BRINLEY-MORGAN, W.J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N.R.; HOLD, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. v. 1, p. 377-388, 1984.

CHAPPEL, R. J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v. 16, n. 2, p. 3-5, 1989.

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

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, n. 5013, v. 252, p. 1643- 1651, 1991.

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

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688–2693, 2007.

HARTIGH, A, B.; ROLÁN, H, G.; JONG, M.F.; TSOLIS, R, M. *virB3* to *virB6* and *virB8* to *virB11*, but not *virB7*, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 13, p. 4427-4436, July 2008.

HUBER, J.D., NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.47, p.1529-1531, 1986.

LAPAQUE, N.MORYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella lipopolysaccharide* acts as virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, n. 1, v. 8, p. 60-66, Feb. 2005.

MORENO, E.; CLOECKART, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Washington, v. 90, p. 209-227, 2002.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine *brucellosis*. *Advances in Veterinary Science & Medicine*. v. 24, p. 69–98, 1980.

NICOLETTI, P. Relationship between animal and human disease. In: Young, E. J.; Corbel, M. J. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Flórida, p. 41-51, 1989.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. *Brucellosis* bovina. In: **Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres**. Seção 2.3, Cap. 2.3.1, p. 445-476, 2004.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. 1a ed., Jaboticabal, Ed. Funep, 2003.

SCHOLZ, H. C. *et al.* *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 58, p. 375-382, 2008.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

YOUNG, E.J. *Human brucellosis*. reviews of infectious diseases, v. 5, p. 821-842, 1983.

YOUNG, E.J. *Brucellosis: A model zoonosis in developing countries*. acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica. supplementum, v. 3, p. 17-20, 1988.