UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

DETECÇÃO POR PCR DE GENES ESPECÍFICOS DE *BRUCELLA ABORTUS* EM SORO SUÍNO.

Thaís de Campos Oliveira
Orientadora: Dra. Simone Perecmanis

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2017

THAÍS DE CAMPOS OLIVEIRA

DETECÇÃO POR PCR DE GENES ESPECÍFICOS DE *BRUCELLA ABORTUS* EM SORO SUÍNO.

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Simone Perecmanis

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2017

Oliveira, Thaís de Campos

Detecção por PCR de genes específicos de *Brucella abortus* em soro suíno. / Thaís de Campos Oliveira; orientação Simone Perecmanis. – Brasília, 2017.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.]

Nome do Autor: Thaís de Campos Oliveira

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Detecção por PCR de genes específicos de *Brucella abortus* em soro suíno

Ano: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Thaís de Campos Oliveira

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS 5
RESUMO 6
INTRODUÇÃO 7
MATERIAIS E MÉTODO 8
RESULTADOS 11
DISCUSSÃO 12
CONCLUSÃO 13
REFERÊNCIAS 14

LISTA DE ABREVIATURAS

1. 2-ME	2-Mercaptoetanol
2. AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
3. DNA	ácido desoxirribonucléico
4. dNTP	desoxirribonucleotídeos
5. et al.	e colaboradores
6. FC	Fixação de complemento
7. PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
8. SDS	Solução de Dodecilsulfato de Sódio
9. TAL	Anel em Leite
10. Taq	*Thermus aquaticus*
11. TE1X	tampão Tris-EDTA
12. TEN2X	tampão Tris-EDTA-NaCl

RESUMO

A crescente demanda mundial por carne suína tem favorecido o Brasil, que permanece como o quarto lugar no ranking de produção e exportação desse produto nos últimos anos. Dentre os agentes etiológicos que acometem suínos, encontram-se a *Brucella suis* e a *Brucella abortus*, que influenciam diretamente nos índices de produtividade sendo, dentre os muitos microrganismos, responsáveis por problemas reprodutivos, queda de desempenho de leitões e descarte de matrizes e varrões em granjas. O teste AAT vem sendo utilizado para triagem em produções, no caso de suspeita da doença, no entanto, não existe precisão quando a espécie do agente nesse teste. A confirmação quanto ao agente é de extrema importância visto que, embora exista uma predileção por hospedeiros específicos, infecções cruzadas são observadas no caso da brucelose. A precisão diagnóstica pode ser obtiva através de métodos de diagnóstico molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ainda pouco explorada no contexto dessa doença. O objetivo desse trabalho foi realizar a detecção molecular do gene específico da sequência 711 (IS711) de *Brucella abortus* em amostras de soro suíno positivas no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).

Palavras-Chaves: Suínos; Extração de DNA; Brucelose; PCR.

ABSTRACT

The growing world demand for pork has favored Brazil, which remains the fourth place in the ranking of production and export of this product in the last years. Among the etiological agents that affect pigs are *Brucella suis* and *Brucella abortus*, which directly influence the productivity indexes, being among the many microorganisms responsible for reproductive problems, performance drop of piglets and discard of matrices and boars on farms. The AAT test has been used for screening in productions, in case of suspected disease, however, there is no precision when the species of the agent in that test. Confirmation of the agent is extremely important since, although there is a predilection for specific hosts, cross-infection is observed in the case of brucellosis. Diagnostic accuracy can be obtained through molecular diagnostic methods, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), which has not yet been explored in the context of this disease. The objective of this work was to perform the molecular detection of the

711 (IS711) sequence specific gene of Brucella abortus in swine serum positive samples in the Buffer Acidified Antigen (AAT) test.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína. Em 2016, foram produzidas 3,73 milhões de toneladas, sendo dessas, 732,9 mil exportadas, representando um aumento de 32% em relação às exportações de 2015 (EMBRAPA, 2017). Esse aumento na produção reflete uma boa situação no mercado interno e externo para a suinocultura, (ZANELLA, 2016; GUIMARÃES et al., 2017) no entanto, baixos índices de produtividade em toda cadeia ainda são registrados no país, decorrentes de fatores como: manejo inadequado, desequilibro nutricional, problemas sanitários, falta de treinamento e capacitação dos trabalhadores, e diagnósticos imprecisos. (SABES, 2016; MATHIAS, 2008; PLUMB et al., 2013; RIGUEIRA, 2017; RIBAS, 2017). As doenças de rebanho ainda estão presentes na maior parte de pequenas propriedades e em granjas tecnificadas. Diagnósticos imprecisos e subnotificações são fatores decisivos para a manutenção de agentes em rebanhos (MORES et al., 2011; CAITANO et al., 2014; COTRIM et al., 2015;).

A brucelose é uma doença infectocontagiosa, causada por uma bactéria gram negativa, imóvel e não flagelada, aeróbia, intracelular facultativa. Embora cada uma das espécies desse gênero possua um hospedeiro preferencial, infecções de uma mesma espécie em diferentes animais, podem ser observadas. No Brasil a espécie mais prevalente é a *Brucella abortus*, seguida pela *Brucella suis* (GOMES, 2013; CAITANO et al., 2014). Os suínos podem ser infectados, por ambas as espécies, através de contato direto com animais acometidos, ingestão de alimentos ou água contaminados, contato com fetos abortados, envoltórios fetais e descargas vulvares. As fêmeas infectadas apresentam abortamento que pode ocorrer em qualquer fase da gestação (FAO, 2003; POESTER et al., 2009). Por se tratar de uma zoonose essa afecção apresenta também grande risco para a saúde pública, em especial para aqueles que operam em granjas e indústrias, sendo considerada uma doença ocupacional na qual a educação sanitária se faz indispensável (MEIRELLES-BARTOLI et al., 2014; COTRIM, 2015; MAURELIO, 2016; MUFINDA et al., 2017).

O principal método diagnóstico utilizado para brucelose baseia-se em detecção de anticorpos contra o agente, também chamado de método indireto ou sorológico. São encontrados diversos testes diagnósticos indiretos, sendo assim, através do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Bruceluse e Tuberculose – PNCEBT, são definidos, como oficiais, os seguintes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel em Leite (TAL), e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de complemento (FC). Dentre os métodos diretos, encontra-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que possibilita a identificação específica do agente e espécie, no entanto, esse não é tido como método oficial pelo programa. Para fins de trânsito interestadual, seja para exposições ou para animais destinados a reprodução, é obrigatória a apresentação de resultados negativos, válidos por 60 dias, aos testes de diagnóstico aplicados (BRASIL, 2006; GOMES, 2013).

O teste de soroaglutinação AAT não indica o título de anticorpos do soro testado, sendo considerado ideal apenas como teste de triagem do rebanho (MEIRELLES-BARTOLI et al., 2014; BRASIL, 2016). O objetivo desse trabalho foi realizar a detecção molecular, por PCR, do gene específico da sequência 711 (IS711) de *Brucella abortus* em amostras positivas ao teste de soroaglutinação AAT.

MATERIAIS E MÉTODO

Obtenção das amostras de soro

Foram utilizadas 128 amostras de soro suíno reagentes ao teste de triagem AAT Tecpar®, para *Brucella abortus*, realizado previamente em projeto de pesquisa anterior (RIGUEIRA, 2017), no qual apenas uma dessas amostras foi positiva também ao teste confirmatório 2-Mercaptoetanol (2-ME). Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA.

Extração de DNA

As amostras de soro foram submetidas a extração de DNA por protocolo baseado e adaptado do descrito por Barea et al. (2004), utilizando-se 100µl de soro com adição de 25µl de TEN2X, 25µl de SDS e 5µl de Proteinase K. As amostras foram colocadas em banho-maria por 30 minutos à 56ºC, e após foi adicionado 250µl de fenol com posterior agitação em vórtex por 2 (dois) minutos seguido de descanso por

15 minutos. Após o descanso, foi realizada centrifugação por 20 minutos, à 13000 rpm e 22°C. Foi pipetado o sobrenadante, porção mais superficial onde encontra-se nessa fase o DNA, e adicionado 500µl de etanol gelado à -20°C. O material foi deixado por 20 minutos à - 20°C, sendo novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. Os eppendorfs, foram deixados abertos e voltados para baixo, dentro do fluxo laminar, a fim de eliminar todo liquido, restando apenas o pellet. O extraído foi então ressuspendido em 50µl de TE1X.

Obtenção de controles positivos

Foram submetidas ao mesmo protocolo de extração, amostras do reagente de TAL Tecpar® e de AAT Tecpar®. O teste AAT é uma prova qualitativa cujos resultados obtidos são: reagente ou não reagente. Não são encontrados no mercado kits diagnósticos específicos para suínos, sendo assim, o produto utilizado nesse trabalho foi o antígeno para diagnóstico de brucelose bovina que consiste em suspensão celular inativada de *Brucella abortus*, corada com rosa de bengala. O teste TAL é utilizado como triagem, para bovinos, e utiliza corante hematoxilina. Ambos os testes são obtidos a partir da suspensão inativada *de Brucella abortus*, amostra 1119-3.

Quantificação de DNA

A espectrofotometria é um procedimento analítico que, através da interação da luz branca com a matéria, auxilia na determinação de biomoléculas, medindo suas concentrações em soluções (PORTELA, 2017). A quantificação do extraído foi mensurada em espectrofotômetro, onde o grau de pureza do material foi valorado. O valor ideal dessa quantificação, para amostras de DNA, encontra-se entre 1,8 e 1,9. A presença de proteínas e compostos aromáticos utilizados na extração podem interferir nesses valores. (BRÍGIDO, 2016).

Amplificação de DNA

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi realizada a partir do DNA extraído do soro para detecção de *Brucella abortus* utilizando o par de primers que amplificam a sequência de inserção 711 (IS711) originalmente descritos por Garshasbi et al. (2014), gerando amplicons de 498pb (Tabela 1). Foram empregados

os protocolos experimentais, baseando- se no descrito por Garshasbi et al. (2014) e Miyashiro et al. (2004), para preparo do mix (Quadro 1).

As amostras utilizadas nas amplificações foram as extraídas a partir de Ring Test e da amostra positiva para o 2-ME. Na PCR, antes do ciclo de temperaturas, procedeu-se a desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e, ao final, a extensão a 72°C por 5 minutos conforme descrito por Garshasbi et al. (2014). Foram empregados 40 ciclos divididos em três fases: desnaturação a 95°C por 90 segundos, hibridação com valores variando entre 55°C – 61°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos (Gráfico 1).

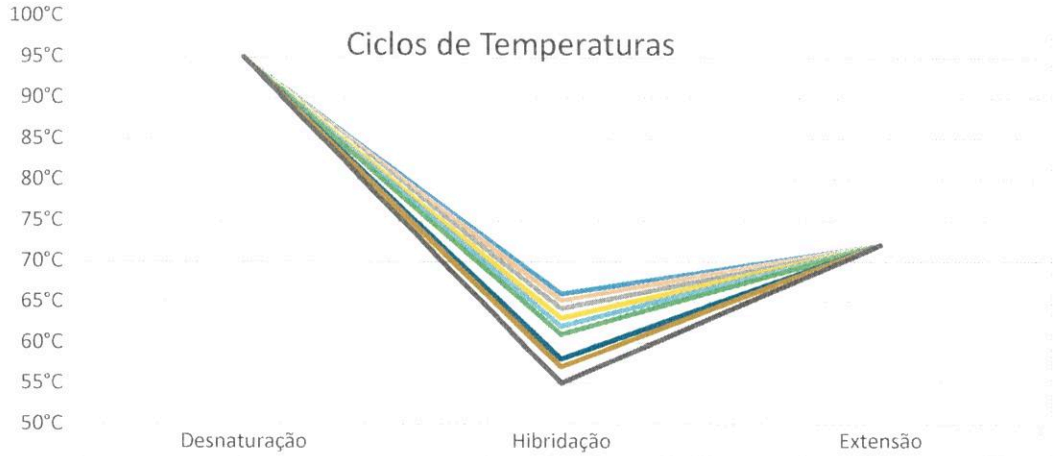
Tabela 1: Sequência de primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella abortus.*

PRIMERS	SEQUÊNCIA
IS711	F: 5' -TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3'
IS711	R: 5' -GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC-3'

Quadro 1 – Protocolos experimentais utilizados para preparo de mix.

	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4
Água Milli-Q	14,75µl	13,25µl	10,75µl	12,65µl
Amostra	3,0µl	3,0µl	5,0µl	5,0µl
Tampão	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
dNTP	1,0µl	1,0µl	1,0µl	0,5µl
Primer F	1,0µl	2,0µl	2,0µl	1,5µl
Primer R	1,0µl	2,0µl	2,0µl	1,5µl
Taq	1,0µl	0,50µl	1,0µl	0,6µl
Mg	0,75µl	0,75µl	0,75µl	0,75µl

Gráfico 1 – Ciclos de temperaturas empregados para amplificação de DNA.



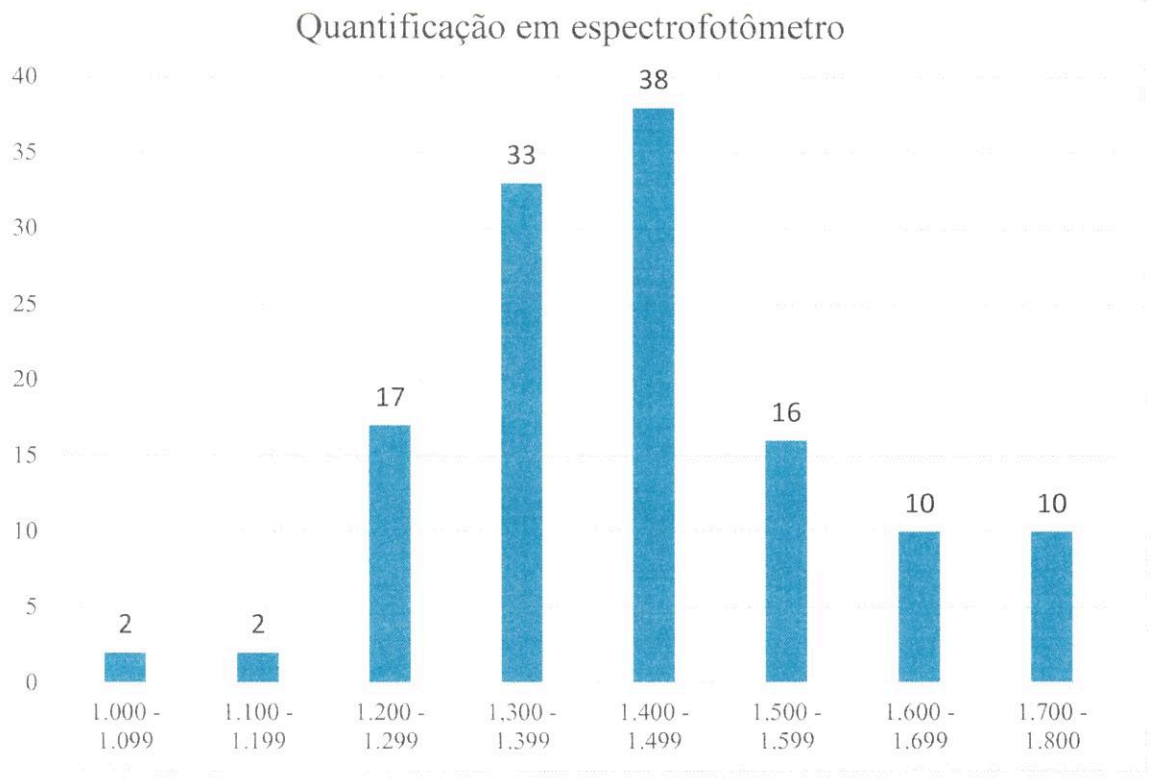
	Desnaturação	Hibridação	Extensão
A	95°C	66°C	72°C
B	95°C	65°C	72°C
C	95°C	64°C	72°C
D	95°C	63°C	72°C
E	95°C	62°C	72°C
F	95°C	61°C	72°C
G	95°C	58°C	72°C
H	95°C	57°C	72°C
I	95°C	55°C	72°C

RESULTADOS

As amostras de soro positivas ao AAT foram quantificadas por espectrometria (Gráfico 2). Embora os resultados obtidos não estejam na margem considerada ideal, entre 1.8 e 1.9, conforme já descrito por Salman et al. (2006) e Simonato et al. (2007), resultados próximos a esse valor também são possíveis de amplificação. Os resultados obtidos na quantificação das amostras dos reagentes de TAL e de AAT foram, respectivamente, 1.864 e 1.802.

Não foi obtida amplificação do gene específico da sequência 711 (IS711) de *Brucella abortus* após as tentativas descritas, nas amostras utilizadas.

Gráfico 2 – Resultados obtidos a partir de quantificação feita em espectrofotômetro.



DISCUSSÃO

Diversos fatores podem influenciar na eficiência da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dentre esses, pode-se destacar, as concentrações de íons de magnésio, dNTPs e taq polimerase, as temperaturas e tempos em cada ciclo, e contaminantes nas amostras. Em seu trabalho, Pilz et al. (2005), discorre sobre necessidade de padronização da PCR, uma vez que, variações podem levar a resultados imprecisos no diagnóstico molecular. Neste trabalho o protocolo utilizado reproduziu a metodologia proposta por Garshasbi et al. (2014) e Miyashiro et al. (2004). Apesar das temperaturas, concentrações de reagentes e tempos seguiram fielmente o descrito por ambos autores não foram observadas amplificações. Assim sendo, a ausência de amplificação pode ser atribuída a dois fatores que divergiram do descrito anteriormente: a origem do material e os reagentes.

Embora o soro sanguíneo seja um material clínico pouco utilizado como fonte para extração de material genético, Pilz et al. (2005) descreve em seu trabalho

resultados positivos a partir desse material. Ele descreve que a amostra de soro seria inclusive preferível quando comparada ao sangue total uma vez que a hemoglobina e o DNA de leucócitos atuariam como inibidores da PCR. Por a *Brucella abortus* se tratar de um microrganismo intracelular facultativo (GOMES, 2013) e observando a quantificação feita em espectrofotômetro é possível assumir que a escolha do material utilizado não foi um empecilho para a amplificação.

Dentre os reagentes adicionados ao mix, encontra-se a *Taq* polimerase, enzima termoestável recombinante, responsável pela síntese de novas cadeias de DNA, fundamental para o bom desempenho da reação. Segundo Cavalcanti (2007) e Oliveira et al. (2015) relatam em suas pesquisas, o uso de diferentes *Taq* DNA polimerases podem gerar resultados discrepantes devido ao desempenho da enzima. Sendo assim, a não amplificação das amostras nesse trabalho pode ser justificada por esse fator.

CONCLUSÃO

Neste trabalho não foi observada a amplificação do gene específico da sequência 711 (IS711) de Brucella abortus seguindo fielmente as instruções conforme protocolos da reação em cadeia da polimerase aplicados.

REFERÊNCIAS

BAREA, Jaqueline A.; PARDINI, Maria Inês M. C.; GUSHIKEN, Tsieko. **Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR)**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, v. 26, n. 4, p. 274-281, dez. 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842004000400008&lng=pt&nrm=iso>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. (PNCEBT)** / organizadores, Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador. Picão Gonçalves. - Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

CAITANO, Marrielen A.B. et al . **Detecção de Brucella abortus em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR[1].** Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro , v. 34, n. 6, p. 497-502, June 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000600001&lng=en&nrm=iso>.

CAVALCANTI, Hebe Rodrigues et al. **Do DNA extraction methods and Taq polimerase quality improve the double repetitive element (DRE) PCR typing method for Mycobacterium tuberculosis strains?.** Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 38, n. 3, p. 409-412, Sept. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000300004&lng=en&nrm=iso>.

COTRIM, Jeferson Alaur Basso et al. **Avaliação sanitária de suínos de criações não tecnificadas no município de Jaboticabal**. In: Congresso de extensão universitária da UNESP. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2015. p. 1-4.

Embrapa; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; **Central de inteligência de aves e suínos; Estatísticas de desempenho da produção;** Brasil, Março 2017. Disponível em <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>.

FAO; Animal Production and Health; Paper 156; **Guidelines For Coordinated Human and Animal Brucellosis Surveillance;** Chapter 2 Review of the epidemiology of brucellosis; Rome, Italy, 2003. <http://www.fao.org/docrep/006/y4723e/y4723e04.htm>.

GARSHASBI, Maryam et al. **Molecular detection of Brucella species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran**. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 45, n. 2, p. 533-538, June 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822014000200022&lng=en&nrm=iso>.

GUIMARÃES, Diego Duque et al. **Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 45, 2017.

GODFROID, J.; KÄSBOHRER, **A. Brucelosis in the european union and norway at the turn of the twenty-first century.** Veterinary Microbiology. v. 90, 2002, p. 135-145.

GOMES, Marcos JP. **Gênero Brucella spp.** FAVET-UFRGS - 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella%204-2013-1.pdf>.

MAURELIO, Anna Paula Vitirito et al. **Situação epidemiológica mundial da brucelose humana.** Veterinária e Zootecnia, v. 23, n. 4, p. 547-560, 2016.

MATHIAS, L.A. 2008. **Brucelose animal e suas implicações em saúde pública**. Biológico, São Paulo, 70(2):47-48.

MEIRELLES-BARTOLI, Raphaella Barbosa; DE SOUSA, Daniel Bartoli; MATHIAS, Luis Antonio. **Aspectos da brucelose na saúde pública veterinária**. PUBVET, v. 8, p. 1136-1282, 2014.

MESQUITA, Ricardo Alves et al. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR**. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 15, n. 4, p. 314-318, 2001.

MIYASHIRO, Simone et al. **Detection of Brucella abortus DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR).** Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 38, n. 1, p. 17-22, março, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100005&lng=en&nrm=iso>.

MORES, Nelson; ZANELLA, JRC. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil**. Embrapa Suínos e Aves-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2011.

MUFINDA, Franco Cazembe; BOINAS, Fernando; NUNES, Carla. **Prevalência e factores associados à brucelose humana em profissionais da pecuária**. Revista de Saúde Pública, v. 51, p. 1-10, 2017.

OLIVEIRA, Francisca Laís Araújo de et al. **Use of different Taq DNA polymerases for detection of Chlamydia trachomatis in cervical samples.** Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 6, n. 4, p. 19-24, dez. 2015. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000400003&lng=pt&nrm=iso>.

PILZ, Daniela; ALFIERI, Alice F.; ALFIERI, Amauri A. **Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sangüíneo, artificialmente contaminados**. Semina: Ciências Agrárias, v. 26, n. 2, 2005.

POESTER, F. et al. **Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, [s.l.], v. 61, p.01-05, 2009

PORTELA, Benedito et al. **ESPECTROFOTOMETRIA, ESSENCIAL PARA ANÁLISES CLÍNICAS.** Mostra Científica em Biomedicina, v. 1, 2017.

PLUMB G.E., Olsen S.C. & Buttke D. 2013. **Brucellosis: 'One Health' challenges and opportunities.** Rev. Scient. Tech. Off. Int. Epiz.

RIGUEIRA, Luciana Lana. **Soroprevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal**, Brasil. 2017. xiii, 72 f., il. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017

SABES, Amanda Festa; GIRARDI, Annita Morais; DE OLIVEIRA, Luis Guilherme. **Prevalência, controle e erradicação da brucelose suína**. INVESTIGAÇÃO, v. 15, n. 4, 2016.

SIMONATO, Luciana Estevam et al. **Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, p. 121-127, 2007.

SALMAN, A. K. D.; LAUREANO, M. M. M. **Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pêlo de bovinos.** Embrapa Rondônia-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.

Técnicas básicas em biologia molecular. Marlene Teixeira de Souza, Marcelo de Macedo Brígido, Andréa Queiroz Maranhão, organizadores. – 2. Ed. – Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2016.

VALONES, Marcela Agne Alves et al. **Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review.** Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-11, mar. 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822009000100001&lng=pt&nrm=iso>.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.** Protozoologia - IMTSP/Laboratório de Biologia Molecular – IPEN; V. 30, 2011 Disponível em < http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>.

ZANELLA, Janice Reis Ciacci; MORES, Nelson; BARCELLOS, David Emilio Santos Neves de. **Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 51, n. 5, p. 443-453, May 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2016000500443&ln>.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: OLIVEIRA, Thaís de Campos

Título: Detecção por PCR de genes específicos de *Brucella abortus* em soro suíno.

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 11/12/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Simone Perecmanis — Instituição: UNB

Julgamento: APROVADO — Assinatura:

M. V. Ana Paula Paiva de Faria — Instituição: Exército Brasileiro

Julgamento: Aprovada — Assinatura:

M. V. Luciana Lana Rigueira — Instituição: SEAGRI - DF

Julgamento: APROVADA — Assinatura: Luciana Lana Rigueira