

# **Valéria Spyridion Moustacas**

Cinética da infecção experimental e desenvolvimento de  
PCR multiplex para o diagnóstico de infecções por  
*Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*  
em carneiros

Tese apresentada à UFMG, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutor  
em Ciência Animal com ênfase em  
Reprodução Animal.

**Orientador:** Prof. Renato de Lima Santos

**Co-orientadores:** Prof. Marc Henry

Érica Azevedo Costa

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária – UFMG**  
**2013**

M933c Moustacas, Valéria Spyridion ,1983-  
Cinética da infecção experimental e desenvolvimento de PCR multiplex para o diagnóstico de infecção por *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* em carneiros / Valéria Spyridion Moustacas. – 2013.

73p.: il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientadores: Marc Roger Jean Marie Henry

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Carneiro – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Sistema urogenital – Lesões – Teses. 3. Reação de cadeia em polimerase – Teses. 4. Epidídimo – Doenças – Teses I. Santos, Renato Lima. II. Henry, Marc Roger Jean Marie. III. Costa, Érica Azevedo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

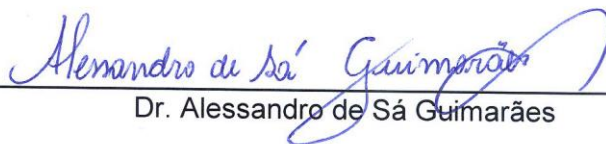
CDD – 636.308 96

Tese defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente



---

Dr. Alessandro de Sá Guimarães



---

Prof. Rinaldo Aparecido Mota



---

Prof. Alan Maia Borges



---

Profª. Juliana Pinto da Silva Mol



“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Ao Raphael, meu esposo, fonte de motivação e inspiração profissional e aos meus pais, Valéria e Vassilis (*in memoriam*), por sempre acreditarem em mim.

## **Agradecimentos**

Ao prof. Renato de Lima Santos, pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos prestados. Minha eterna gratidão e admiração.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Professor Marc Henry e à Dra. Érica Costa por participarem do meu comitê de orientação.

Aos professores dos setores de Reprodução Animal e Patologia da Escola de Veterinária, sempre presentes durante minha jornada na pós-graduação.

À minha amiga e co-orientadora Érica, por toda a paciência em me ensinar, por participar ativamente dos longos experimentos e, principalmente, pela amizade.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação, Ana Patrícia, Auricélio, Custódio, Luciana, Silvia e Teane pelo acolhimento, ajuda nos experimentos e pelos ótimos momentos proporcionados. Sentirei saudade...

A todos os alunos iniciação científica que participaram do projeto, pela disponibilidade e cooperação durante os experimentos.

À minha família, que mesmo longe, sempre estiveram presentes em minha vida.

Às amigas Cristina Pedroso e Carmem Stockler, pelo carinho e palavras de apoio em todos os momentos difíceis que passei ao longo desses anos.

Ao meu esposo, Raphael Mourão, pela paciência e apoio, principalmente na fase final de confecção da tese.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPEMIG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	11
. . . . .	
<b>ABSTRACT</b> .....	12
. . . . .	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
. . . . .	
<b>2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 EPIDIDIMITE INFECCIOSA OVINA.....	14
2.2 SINAIS CLÍNICOS.....	14
2.3 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	15
2.4 ETIOLOGIA.....	16
. . . . .	
2.5 DIAGNÓSTICO DA EPIDIDIMITE INFECCIOSA OVINA.....	18
2.5.1 Exame clínico-andrológico.....	18
2.5.2 Sorologia.....	18
. . . . .	
2.5.3 Isolamento bacteriano.....	19
2.5.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
<b>3 CAPÍTULO II: CINÉTICA DAS INFECCÕES EXPERIMENTAIS POR <i>Actinobacillus seminis</i> E <i>Histophilus somni</i> EM CARNEIROS</b> .....	21
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
. . . . .	
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.2.1 INFECCÃO EXPERIMENTAL E COLETA DE AMOSTRAS.....	21
3.2.2 BACTERIOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	22
3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	23
. . . . .	
3.3.1 ACHADOS CLÍNICOS.....	23
3.3.2 ISOLAMENTO BACTERIANO.....	28
3.3.3 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	31
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	39
. . . . .	
<b>3.5 CONCLUSÃO</b> .....	40
. . . . .	

---

<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III: PCR MULTIPLEX ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR <i>Brucella ovis</i>, <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> EM CARNEIROS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL MÉTODOS.....</b>	<b>E 42</b>
4.2.1	COLETA AMOSTRAS.....	DE 42
4.2.2	CULTURA BACTERIOLÓGICA.....	42
4.2.3	EXTRAÇÃO DNA.....	DE 42
4.2.4	PCR SIMPLES.....	43
4.2.5	PCR MULTIPLEX.....	43
4.2.6	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR MULTIPLEX.....	44
4.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.3.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Actinobacillus seminis</i> .....	45
4.3.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Histophilus somni</i> .....	48
4.3.3	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR MULTIPLEX.....	51
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Frequência (%) de isolamento de <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> em sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiros experimentalmente infectados ao longo de seis semanas de infecção.....	29
<b>Tabela 2.</b>	Tabela 2: Distribuição, frequência e intensidade de lesões inflamatórias em órgãos de carneiros experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i> .....	37
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição, frequência e intensidade de lesões inflamatórias em órgãos de carneiros experimentalmente infectados com <i>Histophilus somni</i> .....	37
<b>Tabela 4.</b>	Condições de ciclagem utilizadas para a PCR simples e PCR multiplex para o diagnóstico das infecções por <i>Brucella ovis</i> , <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> em ovinos.....	43
<b>Tabela 5.</b>	Frequência (%) de detecção de <i>Actinobacillus seminis</i> por PCR e bacteriologia de sêmen, sangue, urina, lavado prepucial e tecidos de carneiros experimentalmente infectados após seis semanas de infecção, concordância entre os métodos (%) e	46



	valores	de
	Kappa.....	
<b>Tabela 6.</b>	Frequência (%) de detecção de <i>Histophilus somni</i> por PCR e bacteriologia de sêmen, sangue, urina, lavado prepucial e tecidos de carneiros experimentalmente infectados após seis semanas de infecção, concordância entre os métodos (%) e valores de Kappa.....	49
<b>Tabela 7.</b>	Sensibilidade analítica da PCR simples e multiplex em sêmen contaminado com $10^0$ a $10^6$ UFC/mL de <i>Brucella ovis</i> , <i>Actinobacillus seminis</i> ou <i>Histophilus somni</i> .....	51
	..	
<b>Tabela 8.</b>	Detecção simultânea do DNA de <i>Brucella ovis</i> , <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> por PCR multiplex em combinações de amostras de sêmen provenientes de carneiros experimentalmente infectados.....	52
<b>Tabela 9.</b>	Especificidade da PCR simples e multiplex com diferentes espécies bacterianas relacionadas à epididimite ovina ou filogeneticamente similares a <i>Brucella ovis</i> .....	53

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Circunferência escrotal de carneiros experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i> (n=10) ou <i>Histophilus somni</i> (n=10) durante 42 dias de infecção.....	24
	..	
<b>Figura 2.</b>	Consistência testicular de carneiros experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i> (n=10) ou <i>Histophilus somni</i> (n=10) durante 42 dias de infecção.....	25
	..	
<b>Figura 3.</b>	Comprimento e largura testiculares de carneiros experimentalmente infectados por <i>Actinobacillus seminis</i> ou <i>Histophilus somni</i> durante 6 semanas de infecção.....	26
	..	
<b>Figura 4.</b>	Comprimento (A) e largura (B) das caudas dos epidídimos de carneiros experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i> (n=10) ou <i>Histophilus somni</i> (n=10) durante o curso das infecções.....	27
<b>Figura 5.</b>	Frequência (%) de carneiros positivos por isolamento bacteriano para <i>Actinobacillus seminis</i> (n=10) ou <i>Histophilus somni</i> (n=10) ao longo de 42 dias de infecção experimental. (A) sêmen; (B) urina; (C) lavado prepucial.....	28
<b>Figura 6.</b>	Frequência (%) de detecção de <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> por bacteriologia de tecidos de carneiros experimentalmente infectados após seis semanas de infecção.....	30
<b>Figura 7.</b>	Carneiros experimentalmente infectados por <i>Actinobacillus seminis</i> . (A e B) Abscesso epididimário. (A) Cauda do epidídimo esquerdo intensamente aumentado de volume com área focal elevada de coloração amarelada e (B) ao corte preenchido por fluido viscoso amarelado (purulento). (C) Atrofia testicular associada à fibrose difusa da túnica vaginal. Testículo esquerdo diminuído de volume e túnica vaginal espessada e firmemente aderida ao testículo. (D) Epididimite purulenta. Cauda do epidídimo circundada de material purulento associado à hemorragia.....	32

<b>Figura 8.</b>	Carneiros experimentalmente infectados por <i>Histophilus somni</i> . (A e B) Epididimite associada à atrofia testicular. Corpo e cauda de epidídimo esquerdo com intenso aumento de volume, túnica vaginal aderida e testículo ipsilateral intensamente diminuído de volume. (B) Hematoma na túnica vaginal na região adjacente à cauda do epidídimo esquerdo. (C) Abscesso epididimário. Corpo do epidídimo esquerdo com intenso aumento de volume, espessamento da parede e ao corte área focal com material viscoso amarelado. (D) Periorquite crônica. Aderências multifocais entre testículo e túnica vaginal.....	33
<b>Figura 9.</b>	Carneiros experimentalmente infectados por <i>Actinobacillus seminis</i> . (A) Cauda de epidídimo, infiltrado linfo-histio-plasmocitário intersticial intenso focal. HE 200X. (B) Testículo, degeneração intensa com redução das camadas do epitélio seminífero, Bouin 400X (C) Cauda epidídimo, granuloma espermático, HE 200X. (D) Cauda de epidídimo, imunomarcção livre e em citoplasma de células inflamatórias do granuloma, Spretavidina-peroxidase 600X. (E) Vesícula seminal, infiltrado inflamatório intersticial e intraluminal, HE 400X. (F) Vesícula seminal, imunomarcção dentro de citoplasma de macrófagos no lume glandular (seta), Spretavidina-peroxidase 600X.....	35
<b>Figura 10.</b>	Carneiros experimentalmente infectados por <i>Histophilus somni</i> . (A) Cauda do epidídimo, infiltrado inflamatório mononuclear difuso, HE 100X. (B) Cauda do epidídimo, múltiplos cistos no epitélio epididimário e infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, HE 100X. (C) Corpo do epidídimo, granuloma espermático, HE 400X. (D) Ampola do ducto deferente, infiltrado inflamatório intraluminal e intersticial difuso, HE 200X.....	36
<b>Figura 11.</b>	Frequência de amostras de órgãos positivos por bacteriologia e PCR para <i>Actinobacillus seminis</i> em ovinos experimentalmente infectados após 6 semanas de infecção.....	47
<b>Figura 12.</b>	Frequência de amostras de órgãos positivos por bacteriologia e PCR para <i>Histophilus somni</i> em ovinos experimentalmente infectados após 6 semanas de infecção.....	50
<b>Figura 13.</b>	Eletoforese em gel de agarose de produtos da PCR multiplex para detecção de <i>Brucella ovis</i> , <i>Actinobacillus seminis</i> e <i>Histophilus somni</i> com DNA genômico extraído de culturas puras.....	51

---

### LISTA DE ANEXOS

---

<b>Anexo I.</b>	Resultados da infecção experimental por <i>A. seminis</i> , por carneiro, ao longo das seis semanas de infecção.....	63
<b>Anexo II.</b>	Resultados da infecção experimental por <i>H. somni</i> , por carneiro, ao longo das seis semanas de infecção.....	67
<b>Anexo III.</b>	Resultados de sensibilidade analítica da PCR convencional multiplex, utilizando-se DNA genômico de <i>B. ovis</i> , <i>A. seminis</i> e <i>H. somni</i> , em diferentes concentrações e combinações.....	71

---

## RESUMO

A epididimite infecciosa, considerada uma das maiores causas de prejuízos econômicos na ovinocultura mundial, é causada principalmente pelas bactérias *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. Este trabalho teve por objetivo investigar as lesões genitais causadas pelas infecções por *A. seminis* e *H. somni* em ovinos e desenvolver um método de diagnóstico direto e diferencial para as três infecções. Foram realizadas infecções experimentais, por *A. seminis* e por *H. somni*, em ovinos de 18 a 24 meses de idade. Os carneiros foram examinados semanalmente e foram coletadas diferentes amostras biológicas para fins de diagnóstico. *A. seminis* e *H. somni* foram capazes de causar infecção, colonizando diferentes órgãos do trato genito-urinário, sendo indistinguíveis apenas por exame clínico, achados de necropsia ou histopatologia. Mesmo sem diferenciar o agente etiológico, o exame clínico continuou sendo imprescindível como teste de triagem, pois possibilitou a detecção de indícios de epididimite infecciosa, mesmo antes do teste laboratorial. Por outro lado, para o diagnóstico diferencial, é importante o uso de técnicas de diagnóstico direto, com confirmação do agente etiológico. O ensaio de PCR multiplex espécie-específico desenvolvido no presente estudo foi igualmente eficaz à bacteriologia (padrão-ouro) para o diagnóstico diferencial das três maiores causas de epididimite infecciosa ovina, podendo ser usado em substituição ao isolamento bacteriano. Além disso, urina e lavado prepucial também podem ser usados como amostras alternativas ao sêmen para extração de DNA e emprego da PCR multiplex descrita neste estudo.

Palavras-chave: PCR, diagnóstico, epididimite infecciosa, infertilidade ovina

## ABSTRACT

Infectious epididymitis is considered a major cause of economic losses for the sheep industry worldwide. The most common causative agents include *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. This study aimed to investigate changes associated with experimental infections with *A. seminis* and *H. somni* in rams, and to develop a direct method for differential diagnosis for these three infections. Experimental infections with *A. seminis* and *H. somni* were carried out in rams with 18 to 24 months of age. Rams were weekly examined and biological samples were collected for diagnostic purposes. *A. seminis* and *H. somni* were capable of causing infection, colonizing several organs of the genitourinary tract, being indistinguishable only by clinical exam, necropsy or histopathology. Nevertheless, the clinical exam proved to be indispensable as a screening method. Conversely, the importance of laboratorial diagnostic techniques for direct confirmation of the etiologic agent was demonstrated in this study. Therefore, the species-specific multiplex PCR assay developed in this study can be successfully used for the diagnosis of the three most common causes of ovine infectious epididymitis. Furthermore, this technique is a practical alternative to bacteriology. Urine and preputial wash can be used as alternatives to semen samples for DNA extraction and application of the multiplex PCR described in this study.

Keywords: PCR, diagnosis, infectious epididymitis, ram infertility

## INTRODUÇÃO

A ovinocultura no cenário da pecuária brasileira ganha mais relevância a cada ano. Em 2008, o efetivo ovino no Brasil era aproximadamente 16 milhões de cabeças sendo concentrada mais de 50% dessa população na região Nordeste (Simplício, 2011). Segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo *per capita* de carne ovina no Brasil cresceu 71,4% entre 1997 e 2007. Já o volume de carne ovina produzida nesse período aumentou proporcionalmente ao crescimento dos rebanhos, aproximadamente 12% sendo, contudo, ainda inferior à demanda nacional (FAO, 2009). Além disso, o aumento proporcional entre quantidade de carne produzida e número de animais nos rebanhos indica ausência de aumento de produtividade dos rebanhos nacionais. Além da crescente demanda, o mercado consumidor está cada vez mais exigente, sendo necessária a adoção de medidas que visem não só um aumento na produtividade, mas também na qualidade dos produtos ofertados. Dentre os fatores que mais afetam a produtividade de um rebanho e a qualidade da carne produzida, estão a genética, a nutrição, a sanidade e o potencial reprodutivo dos animais (Pinheiro et al., 2000).

A epididimite infecciosa, uma das principais causas de desordens reprodutivas em ovinos (Santos et al., 2005; Carvalho Junior et al., 2010), compromete significativamente o potencial reprodutivo, impactando negativamente na produtividade do rebanho ovino brasileiro. Na maioria dos casos, as perdas são decorrentes da menor taxa de fertilidade, abortamentos, aumento na taxa de mortalidade neonatal em consequência do baixo peso ao nascimento, menor número de animais produzidos e descarte precoce de animais (McFarlane et al., 1952; Burgess, 1982; Walker et al., 1986; Robles, 1998; Cerri et al., 2002; Santos et al., 2005).

A brucelose ovina por *Brucella ovis*, considerada a principal causa de epididimite infecciosa em carneiros em todo o mundo (Santos et al., 2005), tem sido reportada nas principais regiões produtoras de ovinos, como a Nova Zelândia, Austrália, África do Sul, Europa, América do Norte e em algumas regiões da América do Sul, incluindo o Brasil.

Além da *B. ovis*, outras bactérias comumente envolvidas com a epididimite infecciosa são *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*, ambas pertencentes à microbiota normal prepucial de ovinos, mas que podem atuar como patógenos oportunistas (Burgess, 1982; Walker e Leamaster, 1986; Carvalho Júnior et al., 2010). Apesar de serem umas das principais causas de epididimite ovina em todo o mundo, poucos são os estudos sobre as infecções por *A. seminis* e *H. somni* em ovinos.

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é baseado em exame clínico, testes sorológicos e bacteriologia de amostras de sêmen (Burgess, 1982; Santos et al., 2005). Não existem provas sorológicas amplamente disponíveis para diagnóstico das infecções por *A. seminis* e *H. somni*, sendo o diagnóstico baseado apenas em exame clínico e bacteriologia de sêmen. Apesar de ser considerado como diagnóstico definitivo dessas infecções, o isolamento bacteriano apresenta entraves, principalmente quanto à dependência da viabilidade do agente na amostra e possíveis contaminações por outros microrganismos (Saunders et al., 2007).

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método alternativo aos testes convencionais de diagnóstico por ser mais rápido e sensível (Bricker, 2002). Por ser baseado na amplificação do fragmento de DNA-alvo, o mesmo não depende da viabilidade do agente. Para o diagnóstico de epididimite infecciosa ovina, o material de escolha para a realização do teste é o sêmen,

podendo este, no entanto, ser realizado com outras amostras biológicas, como urina e fragmentos de tecidos (Appuhamy et al., 1998; Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010). A utilização da PCR possibilita ainda o diagnóstico diferencial entre as principais causas de epididimite ovina, em uma única reação, utilizando a chamada PCR multiplex (Saunders et al., 2007). No entanto, o ensaio de PCR multiplex já desenvolvido para o diagnóstico das infecções por *Brucella* spp., *A. seminis* e *H. somni* em ovinos não utiliza iniciadores espécie-específicos para *B. ovis* (Saunders et al., 2007), sendo incapaz de diferenciá-la da infecção por outras espécies de *Brucella* que também acometem ovinos, como a *B. melitensis*.

## **CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA**

### **Epididimite infecciosa ovina**

A epididimite infecciosa ovina causa prejuízos econômicos em todo o mundo, principalmente por diminuir a produtividade dos rebanhos. A queda na produção é decorrente de problemas de fertilidade, diminuição da taxa de natalidade, ocorrência de abortos, natimortos, nascimento de cordeiros fracos, além do descarte precoce de animais (Santos et al., 2005). Devido ao perfil de criação predominantemente extensivo adotado em todo o território nacional, esses efeitos, em geral, são percebidos apenas indiretamente (Gomes et al., 1991).

Visando diminuir essas perdas, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou em 2004, o Programa de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO), e a portaria que regulamenta o Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina por *Brucella ovis* que visa controlar e erradicar a epididimite infecciosa dos

rebanhos nacionais. Segundo o Plano, a epididimite por *B. ovis* é considerada uma enfermidade de notificação compulsória e uma das medidas de controle é o abate sanitário dos animais positivos. Nesse caso, o Serviço Oficial identifica e envia os animais positivos para sacrifício sanitário em abatedouro com inspeção federal, estadual ou municipal, no prazo máximo de 30 dias.

### **Sinais clínicos**

O termo epididimite se refere ao processo inflamatório em qualquer região do epidídimo, sendo, no entanto, mais frequentemente observada na região da cauda (Biberstein et al., 1963; Cerri et al., 2002). A inflamação dos epidídimos pode ter diferentes causas, infecciosas ou não, podendo ocorrer de forma focal, multifocal ou difusa, ou ainda uni ou bilateral (Bagley et al., 1985; Robles, 1998). Sua principal consequência, independentemente da causa primária, é a redução da fertilidade que, em alguns casos, pode se tornar permanente.

Alguns agentes infecciosos podem causar epididimite em ovinos e, além da inflamação dos epidídimos, podem frequentemente levar a lesões testiculares. Os agentes causadores de epididimite ovina podem também colonizar outros órgãos do trato reprodutivo, como vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e ampolas do ducto deferente, não resultando, no entanto, em manifestações clínicas evidentes (Biberstein et al., 1963; Al Katib e Dennis, 2008; Carvalho Júnior et al., 2012).

Independente do agente causador, a enfermidade é clinicamente caracterizada por assimetria, com aumento de volume e de consistência de uma ou ambas as caudas dos epidídimos. Na fase aguda da infecção, pode ocorrer aumento de temperatura e da sensibilidade dolorosa na região afetada (Tonder, 1973; Sponemberg et al., 1983) e o

carneiro pode desenvolver quadro de claudicação. Em casos mais graves, os animais acometidos podem também apresentar hipertermia, inapetência e dispnéia. Aderências entre a região afetada do epidídimo e o folheto parietal da túnica vaginal são frequentes em casos mais graves, chegando muitas vezes à ruptura de abscessos com extravasamento de conteúdo (Tonder, 1973; Sponenberg et al., 1983).

A orquite geralmente é secundária às lesões epididimárias. No entanto, os testículos podem ser diretamente colonizados pelos agentes causadores de epididimite ovina e, na fase aguda da enfermidade, os mesmos podem apresentar aumento de volume e da consistência devido ao processo inflamatório e à presença de obstruções epididimárias. Porém, com o curso da infecção, ocorre degeneração testicular, com tendência à diminuição de consistência e volume dos testículos. Em infecções de caráter crônico, é comum a ocorrência de fibrose. Devido ao processo inflamatório e aderências, os carneiros acometidos pela epididimite infecciosa podem apresentar problemas de termorregulação testicular, o que contribui diretamente para a redução da qualidade espermática (Mieusset et al., 1992).

Apesar da severidade de alguns casos, na maioria delas ocorre regressão dos sinais clínicos (Santos et al., 2005; Carvalho Junior et al., 2012). Por outro lado, a epididimite infecciosa ovina também pode ocorrer de forma subclínica, na qual os animais mesmo infectados não apresentam sintomatologia evidente (Hughes e Claxton, 1968).

### **Alterações anatomo-histopatológicas**

Em casos de epididimite ovina, as lesões macroscópicas mais frequentemente observadas são abscessos, geralmente localizados na cauda do epidídimo, edema de bolsa escrotal, espessamento da túnica

vaginal, periorquite fibrinosa ou fibrosa, aumento das vesículas seminais e das glândulas bulbouretrais (Biberstein et al., 1963). Em alguns casos pode ser observado aumento de volume dos linfonodos inguinais e ilíacos internos.

Microscopicamente, as epididimites bacterianas estão associadas a edema perivascular, inflamação seguida por hiperplasia, obstrução do ducto epididimário com retenção de conteúdo (Baynes e Simmons, 1968). Como consequência, pode ocorrer ruptura do ducto epididimário com extravasamento de espermatozoides, seguida de inflamação granulomatosa e fibrose difusa, com formação de granulomas espermáticos. Metaplasia do epitélio epididimário, proliferação intensa de tecido conjuntivo fibroso ao redor dos ductos epididimários, destruição do epitélio e mineralização, podem também estar associados à enfermidade (Biberstein et al., 1963; Bezerra et al., 2012). As lesões testiculares geralmente são compatíveis com quadro de degeneração testicular, caracterizado principalmente por intensa redução das camadas do epitélio seminífero, menor diâmetro dos túbulos, vacuolização citoplasmática, espermátocitos com núcleos picnóticos e espermiostase. Similarmente ao observado com o tecido epididimário, pontos de mineralização na luz de túbulos seminíferos também são observados na epididimite por *A. seminis* (Bezerra et al., 2012).

Em decorrência das lesões, os carneiros afetados pela epididimite infecciosa geralmente tem a fertilidade prejudicada. Muitas vezes, quando a infecção se torna mais grave e é bilateral, o carneiro acometido pode apresentar esterilidade permanente (Baynes e Simmons, 1960; Tonder, 1973; Carvalho Júnior et al., 2010). Grande parte dos problemas de fertilidade ocorre devido à diminuição da concentração espermática no ejaculado, decorrente da degeneração do epitélio seminífero, e

também ao aumento do percentual de defeitos espermáticos. Como a infecção acomete principalmente os epidídimos, os defeitos morfológicos observados são, em sua maioria, relacionados à maturação espermática, ocorrendo primariamente nas regiões das peças intermediária e principal das células espermáticas. Consequentemente, a motilidade total geralmente é reduzida (Burgess et al., 1982; Bagley et al., 1984; Buckrell et al., 1985; Robles, 1998; Carvalho Júnior et al., 2012).

Outra alteração frequentemente observada no ejaculado de animais afetados pela epididimite infecciosa é a presença de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos (Carvalho Júnior et al., 2012). Esse tipo celular afeta diretamente a qualidade seminal, uma vez que é capaz de produzir espécies reativas ao oxigênio e liberar enzimas hidrolíticas e defensinas, que provocam danos diretos sobre as membranas espermáticas (Aitken et al., 1995; Henkel et al., 2005). Além disso, as células inflamatórias podem ser responsáveis pela veiculação do agente bacteriano intracelular pelo sêmen (botar referencia)

## Etiologia

A epididimite infecciosa pode ser causada por uma variedade de microorganismos, como *Actinobacillus lignieresii*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Chlamydia psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Yersinia pseudotuberculosis*. Porém, os agentes causadores mais frequentes dessa enfermidade são: *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* (Burgess, 1982; Santos et al., 2005; Carvalho Júnior et al., 2010).

A brucelose ovina por *B. ovis* é considerada a principal causa de infertilidade em

rebanhos ovinos no mundo (Burgess, 1982; Santos et al., 2005). *B. ovis* é um coco-bacilo Gram negativo, imóvel e não-capsulado. Seu crescimento ótimo ocorre em meios enriquecidos com sangue e incubação sob atmosfera contendo 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Burgess, 1982). Após 5 a 7 dias de incubação, colônias apresentam cerca de 2 mm de diâmetro, coloração acinzentada, morfologia circular, convexa e superfície brilhante.

A infecção foi descrita pela primeira vez na Nova Zelândia, em 1952, por McFarlane et al. Desde então, foi relatada em diversos de todos os continentes (Buckrell et al., 1985; Niilo et al., 1986; Robles, 1998; Arsenault et al., 2004). No Brasil, a infecção está amplamente distribuída em todo o território nacional, com evidências sorológicas em diversos estados, incluindo Rio Grande do Sul (Ramos et al. 1966; Magalhães Neto e Turnes, 1996), São Paulo (Rizzo et al., 2009), Minas Gerais (Marques, 2006), Distrito Federal (Gonçalves et al., 2005), Paraíba (Clementino et al., 2007), Bahia (Silva et al., 2009), Alagoas (Pinheiro Junior et al., 2009), Rio Grande do Norte (Silva et al., 2003; Azevedo et al., 2004) e Piauí (Costa et al., 2012), chegando a mais de 30% de animais soro-reativos em alguns estados.

A infecção por *B. ovis* acomete com maior frequência animais sexualmente maduros, com a transmissão ocorrendo principalmente pela cópula ou por contato com outros machos, onde as mucosas do pênis, prepúcio, reto, mucosa nasal e ocular, servem como sítios de infecção primária (Burgess, 1982). As fêmeas, geralmente, atuam apenas como veículo transmissor da doença no rebanho. No entanto, quando infectadas, podem apresentar vaginite, endometrite, aborto, além do nascimento de cordeiros fracos e natimortos (McFarlane et al., 1952; Robles, 1998; Foster et al., 1999; Cerri et al., 2002; Santos et al., 2005; Carvalho Júnior et al., 2010).



A infecção por *A. seminis* é a segunda maior causa de epididimite em ovinos em diversas regiões do mundo, porém acometendo mais frequentemente animais jovens. Seu curso pode ser agudo ou crônico, com lesões muito semelhantes às causadas por *B. ovis* (Burgess, 1982; Al-Katib e Dennis, 2007). A bactéria pertence à família Pasteurellaceae, sendo um microrganismo pleomórfico, Gram negativo, imóvel, anaeróbio facultativo, apresentando metabolismo respiratório e fermentativo. Para o crescimento ótimo, os meios devem ser enriquecidos com sangue ou soro, e incubados a 37°C por 24 a 48h, quando formam colônias acizentadas (Scanlan et al., 1989).

O primeiro relato de infecção por *A. seminis* em ovinos foi feito na Austrália, em 1960 (Baynes e Simmons, 1960). Posteriormente, foram confirmados casos nos Estados Unidos, África do Sul, Nova Zelândia, Hungria, Argentina, Reino Unido e Espanha (Livingston e Hardy, 1964; Worthington e Bosman, 1968; Gumbrell e Smith, 1974; Hajtós et al., 1987; Robles et al., 1990; Heath et al., 1991; Puente-Redondo et al., 2000). No Brasil, até o momento, foram relatadas infecções por *A. seminis* nos estados do Rio Grande do Sul (Schreiner et al., 1992; Gomes et al., 2001), São Paulo (Gregory et al., 2009) e Pernambuco (Bezerra et al., 2012).

Apesar do potencial de causar lesões no trato reprodutivo de ovinos jovens, *A. seminis* é um habitante normal da mucosa prepucial e só atua como patógeno oportunista em condições de imunossupressão, como em estresse nutricional, de transporte ou em decorrência de alterações hormonais durante a fase de maturação sexual (Jansen, 1983). Por outro lado, a infecção por *A. seminis* dificilmente acomete ovelhas, pode contudo estar associada a abortos e mastite (Foster et al., 1999).

A epididimite infecciosa em carneiros ainda pode ser causada pelo *Histophilus somni*, previamente denominado como *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* e *Histophilus ovis* (Angen et al., 2003). Assim como *A. seminis*, *H. somni* também pertence à família Pasteurellaceae, sendo pleomórfico, Gram negativo e imóvel. Seu crescimento ótimo ocorre nos meios ágar sangue ou ágar chocolate, enriquecidos com extrato de levedura e sob incubação a 37°C por 24 a 48h, com atmosfera enriquecida com 5 a 20% de CO<sub>2</sub>. Também é encontrado como habitante natural da mucosa prepucial (Humphrey et al., 1982; Krogh et al., 1983) e trato genital feminino (Kwiecien e Little, 1992) podendo também ser encontrado no trato respiratório superior de ruminantes (Humphrey e Stephens, 1983; Corbeil et al., 1986). *H. somni* pode também atuar como um patógeno oportunista, causando epididimite em ovinos, além de pneumonia, meningoencefalite, septicemia, miocardite e pericardite, inclusive em bovinos e caprinos (Walker et al., 1986; Ward et al., 1995; Carvalho Júnior et al., 2010). Fêmeas também podem ser acometidas, desenvolvendo quadro de vaginite, mastite, placentite e endometrite (Rahaley e White, 1977; Philbey et al., 1991; Rizzo et al., 2012). Em cordeiros, a infecção por *H. somni* pode evoluir para septicemia e levar o animal a óbito (Rahaley e White, 1977). Apesar de ser um microrganismo de crescimento fastidioso em laboratório, *H. somni* possui alto potencial patogênico, podendo resistir à ação de neutrófilos e macrófagos bovinos (Hellenbrand et al., 2012). Dessa forma, grande parte da literatura disponível sobre a infecção por *H. somni* está relacionada a bovinos, particularmente a infecções do trato respiratório.

Em ovinos, a infecção por *H. somni* foi descrita pela primeira vez na Austrália, por Roberts (1956) e posteriormente em diversos outros países, como Estados Unidos (Kennedy et al., 1958; Ward et al., 1995),

Reino Unido (Low e Grahan, 1985) e Canadá (Beauregard e Higgins, 1983). No Brasil, a infecção por *H. somni* foi recentemente diagnosticada em ovinos, no estado de São Paulo, como causa de endometrite em ovelha (Rizzo et al., 2012). Diferentemente dos outros países, no Brasil, a infecção por *H. somni* em ovinos ainda não foi amplamente estudada, sendo diagnosticada mais frequentemente em bovinos (Scarcelli et al., 2004; Galiza et al., 2010).

### **Diagnóstico da Epididimite Infecçiosa Ovina**

Diferentes técnicas estão disponíveis para o diagnóstico das principais causas de epididimite infecciosa ovina. No entanto, ainda não há um único método de diagnóstico totalmente satisfatório e, portanto, o diagnóstico definitivo deve contar com a combinação de testes, o que aumenta a confiabilidade dos resultados (Burgess, 1982; West e Bruce, 1991).

#### **Exame clínico-andrológico**

Além de indicador da capacidade reprodutiva dos machos, o exame clínico-andrológico auxilia na pesquisa de possíveis disfunções do trato reprodutivo, sendo uma técnica de fácil execução e de baixo custo, além de não demandar avançada infraestrutura laboratorial. A avaliação clínico-andrológica possibilita a identificação e o isolamento de animais com sinais clínicos de doenças do trato reprodutivo até a confirmação por exames laboratoriais. Dessa forma, o exame clínico-andrológico é uma ferramenta para triagem em casos de suspeita de subfertilidade ou infertilidade em rebanhos. O exame completo é composto por anamnese, exame clínico e espermograma (CBRA, 1998).

Na anamnese, são obtidas informações sobre o histórico reprodutivo do carneiro nas

últimas estações de monta, incluindo número de coberturas, taxa de fertilidade e de natalidade. Ao exame clínico, a genitália externa (bolsa escrotal, testículos, epidídimos, pênis e prepúcio) é inspecionada minuciosamente. Pela palpação de testículos e epidídimos, são avaliadas consistência, mobilidade, temperatura, sensibilidade e presença de nódulos. A avaliação seminal deve ser realizada de acordo com o sugerido pelo Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), observando-se aspecto, cor, odor e volume do ejaculado. Qualquer alteração que indique a presença de substâncias incomuns ao sêmen (sangue, pus, urina) deve ser considerada. Na avaliação espermática, alterações de motilidade, concentração e morfologia podem ocorrer como sinais precoces de infecções no trato reprodutivo. A presença de células inflamatórias no ejaculado é forte indicativo de processo inflamatório no trato reprodutivo (Robles et al., 1998), podendo ser observada até mesmo em animais sem outras manifestações clínicas (Carvalho Júnior et al., 2012).

#### **Sorologia**

A sorologia é o exame laboratorial mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da epididimite por *B. ovis* (Blasco, 1983). No entanto, técnicas sorológicas ainda não estão disponíveis para o diagnóstico das infecções por *A. seminis* e *H. somni* (Hajtos et al. 1987; Gomes et al. 2001).

Diferentes métodos sorológicos têm sido usados para detectar anticorpos anti-*B. ovis* incluindo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Xavier et al., 2011), fixação de complemento (FC) (Clapp, 1962; Alton et al., 1988, Xavier et al., 2011) e testes imunoenzimáticos (ELISA indireta) (Nozaki et al., 2004; Robles, 2008).

O IDGA é o método oficial utilizado por laboratórios credenciados pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* no Brasil (BRASIL, 2004). O teste de IDGA possui alta sensibilidade, sendo baseado na formação de complexo antígeno-anticorpo insolúvel que se precipita no gel, formando uma linha visível após 72 horas de incubação (Myers e Siniuk, 1970).

A FC é o teste sorológico padrão para o diagnóstico da epididimite ovina em programas de erradicação na Austrália e Nova Zelândia (West e Bruce, 1991). Apesar de ser considerado um teste específico, sua principal desvantagem está relacionada à preservação do complemento, que pode perder a estabilidade facilmente levando a resultados falso-negativos. Comparativamente, a FC tem elevada sensibilidade durante a fase aguda da infecção, enquanto o IDGA apresenta sensibilidade mais elevada na fase crônica (Xavier et al., 2011).

O teste de ELISA indireto é apontado como uma das provas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis* (Worthington et al., 1984). Esse teste possui a vantagem de apresentar leitura objetiva, por espectrofotometria, além da utilização de quantidades mínimas de reagentes e soro, e a possibilidade de processamento de grande número de amostras ao mesmo tempo (Robles, 2008). No entanto, a técnica é muito sensível e pequenos erros de manipulação podem influenciar os resultados.

Algumas comparações entre os testes de FC, ELISA e IDGA indicaram que o ELISA apresenta melhores resultados individuais (Worthington et al., 1984; Marín et al., 1989). Já em comparações apenas entre FC e IDGA, apesar dos métodos apresentarem resultados similares de sensibilidade e especificidade, o FC resulta em menor sensibilidade na fase crônica da infecção (Xavier et al., 2011). Dessa forma, a recomendação ainda é a associação de pelo

menos dois testes sorológicos no diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* (West e Bruce, 1991; Xavier et al., 2011).

Cabe ressaltar que, apesar da sorologia ser o método oficial de diagnóstico da epididimite ovina por *B. ovis*, animais infectados e eliminando a bactéria no sêmen ou urina podem ser negativos nos testes sorológicos e animais negativos podem ser positivos no teste (Xavier et al., 2010; Costa et al., 2012).

### **Isolamento bacteriano**

Por confirmar a presença do agente viável na amostra clínica, o isolamento bacteriano é considerado como diagnóstico definitivo em casos de epididimite ovina (Burguess, 1982; West e Bruce, 1991). Sêmen é o material biológico de escolha para diagnóstico bacteriológico de epididimite infecciosa. No entanto, amostras de urina podem ser utilizadas em substituição ou associadas ao sêmen para a pesquisa de tais agentes (Xavier et al., 2010).

Animais infectados por agentes causadores de epididimite podem eliminá-los no sêmen de maneira intermitente e, conseqüentemente, o resultado negativo no cultivo bacteriano pode ter significância questionável (Burguess, 1982; West e Bruce, 1991). Dessa forma, para aumentar a sensibilidade da técnica, são indicadas pelo menos três coletas, com intervalos semanais, para conclusão do diagnóstico (Blasco, 1983). Fragmentos de tecido ou conteúdo de abscessos também podem ser submetidos ao cultivo microbiológico (Xavier et al., 2010).

O meio seletivo para diagnóstico da infecção por *B. ovis* é o Thayer-Martin modificado (Brown et al., 1971), que possui inibidores de crescimento para outros microrganismos (vancomicina, nistatina e colistina). O cultivo deve ser realizado em ambiente com atmosfera suplementada com 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37° C e a leitura das placas realizadas

após 5 a 7 dias de incubação (Alton et al., 1988).

Ainda não estão disponíveis meios seletivos para o diagnóstico das infecções por *A. seminis* e *H. somni* e em casos de suspeita de infecção por um desses agentes, o cultivo deve ser realizado em meios suplementados com sangue ou soro a 37°C por 48h. Além disso, para o crescimento ótimo de *H. somni*, o meio de cultura deve ser enriquecido com extrato de levedura e a atmosfera de incubação suplementada com 5 a 10% de CO<sub>2</sub>. As colônias são identificadas de acordo com a morfologia (Alton et al., 1988) e confirmadas por provas bioquímicas (Meyer e Cameron, 1956; Hatjós et al., 1987) ou métodos moleculares (Appuhamy et al., 1998; Angen et al., 2003; Saunders et al., 2007).

Similarmente às demais técnicas, o cultivo bacteriano também possui desvantagens, como a possível perda de viabilidade dos agentes durante o transporte e/ou armazenamento de amostras, além do crescimento exacerbado de contaminantes ambientais que pode ocorrer em meios não-seletivos, que competem por nutrientes e/ou produzem substâncias tóxicas que impedem o crescimento da bactéria, resultando em resultados falso-negativos (Hughes e Claxton, 1968).

#### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico direto, baseado na amplificação de uma sequência de DNA específica encontrada no genoma de cada organismo. Este método é alternativo aos testes convencionais por ser mais rápido e sensível (Bricker, 2002). Dependendo da metodologia de extração de DNA empregada, o resultado pode ser obtido em poucas horas, ao contrário do isolamento bacteriano, que requer dias de incubação além da realização de provas confirmatórias. Adicionalmente, por não depender da

viabilidade dos agentes, o método pode também ser empregado em amostras submetidas ao congelamento (Xavier et al., 2010). Apesar de ser o sêmen fresco a amostra de escolha, a PCR pode ser realizada em amostras de urina, lavado prepucial e fragmentos de diferentes tecidos do trato genito-rinário de carneiros (Appuhamy et al., 1998; Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010).

Saunders et al. (2007) desenvolveram uma técnica de PCR multiplex que possibilita o diagnóstico das infecções por *Brucella* spp., *A. seminis* e *H. somni* com uma única reação, diminuindo gastos com reagentes e o tempo para o diagnóstico diferencial. No entanto, o método empregado utilizou iniciadores gênero-específicos para detecção de *Brucella* spp., e dessa forma não é capaz de diferenciar a *B. ovis* de outras espécies de *Brucella* que também acometem ovinos, como a *B. mellitensis*, e que possui alto potencial zoonótico.

## **CAPÍTULO II: CINÉTICA DAS INFECÇÕES EXPERIMENTAIS POR *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* EM CARNEIROS**

### **INTRODUÇÃO**

A epididimite infecciosa ovina tem como causas principais as infecções por *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* (Burgess, 1982). No entanto, ao contrário da vasta literatura disponível referente à infecção por *B. ovis*, poucos são os estudos relacionados às infecções causadas por *A. seminis* e *H. somni* em ovinos. Sabe-se que *A. seminis* é um habitante natural da mucosa prepucial ovina,

podendo atuar como patógeno oportunista, levando primariamente a epididimite e orquite em animais jovens (Baynes and Simmons 1960, 1968; Van Tonder 1973; Al Katib e Dennis, 2007). *H. somni* também é um patógeno oportunista, residindo naturalmente na mucosa prepucial ovina e nas mucosas reprodutivas e respiratórias de bovinos. No entanto, existe um maior número de estudos registrados sobre a infecção por *H. somni* em bovinos, quando comparado à espécie ovina (Low e Graham, 1985; Walker e Leamaster, 1986; Ward et al., 1995).

Dessa forma, considerando a importância da epididimite infecciosa na ovinocultura nacional e a escassez de estudos referentes às infecções por *A. seminis* e *H. somni* em ovinos, objetivou-se com o presente estudo caracterizar os achados clínicos e as lesões anatomo-histopatológicas causadas por essas bactérias e sua distribuição no trato reprodutivo de carneiros experimentalmente infectados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Infecção experimental e coleta de amostras**

Foram utilizados 20 carneiros mestiços de Santa Inês, com idade variando entre 18 e 24 meses. Antes do período experimental, os carneiros foram submetidos a teste de triagem para confirmação de que eram livres de epididimite infecciosa por *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*. Foi realizado exame clínico-andrológico, IDGA para diagnóstico da infecção por *B. ovis* e cultura bacteriológica para a pesquisa das três infecções (*B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*) em amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial. Foram constituídos dois grupos experimentais com 10 indivíduos cada. A infecção por *A. seminis* ocorreu no período

de agosto a outubro de 2009 e a infecção por *H. somni* de setembro a novembro de 2010.

Os animais foram alimentados com feno, ração comercial e água *ad libitum*, durante todo o experimento, que foi realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, Brasil (19.52°S, 43.57°W). Os animais foram submetidos a 2 meses de adaptação e treinamento em coleta de sêmen por vagina artificial. Para as coletas, uma ovelha mestiça teve o estro induzido com 2 mg de cipionato de estradiol (ECP - Pfizer Saúde Animal, Brasil) intramuscularmente 48 horas antes da coleta de sêmen. Esse protocolo foi repetido durante todo o experimento sempre que necessário. Após o período de adaptação (Grupo 1: junho a julho de 2009 e Grupo 2: julho a agosto de 2010), o primeiro grupo de 10 carneiros foi inoculado com 1 mL de suspensão contendo aproximadamente  $2,3 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônia (CFU)/mL de *A. seminis* (cepa ATCC 15768) injetada no interior da cauda do epidídimo esquerdo, conforme previamente descrito por Al Katib e Dennis (2005).

O segundo grupo de 10 carneiros foi inoculado com 1 mL de suspensão contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL de *H. somni* (cepa 3384Y) injetada no interior da cauda do epidídimo esquerdo (Al Katib e Dennis, 2005). As infecções experimentais foram realizadas em anos consecutivos e os animais de grupos experimentais diferentes nunca tiveram contato. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG, Protocolos 285/2008 e 002/2010).

Os animais foram clinicamente avaliados antes da inoculação (dia 0) e a cada 7 dias pós infecção (dpi), durante 6 semanas, totalizando sete avaliações por grupo experimental. Clinicamente foi mensurada a circunferência escrotal na região de maior diâmetro testicular, com auxílio de fita

métrica. A consistência testicular foi avaliada por palpação e atribuído escore de 1 (muito flácido e sem elasticidade) a 5 (endurecido). O comprimento e a largura de testículos e caudas de epidídimos foram medidos com paquímetro, sendo o comprimento medido no sentido dorso-ventral e a largura no sentido crânio-caudal. Todas as avaliações clínicas, dos dois grupos experimentais, foram realizadas pelo mesmo examinador.

Sêmen, sangue, urina e lavado prepucial foram obtidos antes da inoculação e a cada 7 dpi, durante 6 semanas, totalizando 7 coletas por grupo. Para evitar contaminações cruzadas entre os carneiros de cada grupo, foi utilizado um plástico estéril, descartável no interior da vagina artificial, conectado diretamente ao tubo de coleta. Três carneiros do primeiro grupo não apresentaram libido durante o período experimental e foram submetidos à eletroejaculação em todas as coletas (Biberstein et al., 1964). O sangue total foi coletado por punção da veia jugular, com sistema de coleta à vácuo. A coleta de urina foi realizada por bloqueio da respiração por 30 segundos. Para o lavado prepucial, 10 mL de PBS estéril foi introduzido na cavidade prepucial, seguido de massagem por 1 minuto e recuperação da suspensão em tubos de 15 mL estéreis (Clark e Dufty, 1978).

### **Bacteriologia, histopatologia e imuno-histoquímica**

Após seis semanas de infecção, os animais foram eutanasiados após sedação com 2 mg de xilasina (Copazine – Schering-Plough Coopers, Brasil) seguida de eletrocução. Para a determinação da distribuição tecidual dos agentes, fragmentos de cauda, corpo e cabeça de ambos os epidídimos, testículos, ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas bulbo-uretrais, linfonodos inguinais e ilíacos, prepúcio, glândula, baço, fígado, rins e bexiga foram coletados. Para análise microbiológica, as

amostras foram acondicionadas em tubos de 50 mL contendo 2 mL de PBS estéril e maceradas com o auxílio de homogeneizador (Polishop, Brasil). Fragmentos dos mesmos tecidos foram armazenados em solução de formalina tamponada a 10% para posterior processamento histológico. Fragmentos de testículos foram também fixados em solução de Bouin.

Para o cultivo bacteriano, 100 µL de cada amostra (homogeneizados de tecidos, sêmen, sangue, urina e lavado prepucial) foram semeados em meio GC (meio base do Agar chocolate, Bectron Dickinson, EUA), suplementado com 1% de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich, Brasil), sem antibióticos e incubadas a 37°C por 48h. Para a detecção de *H. somni*, 0,5% de extrato de levedura (Invitrogen, Brasil) foi adicionado ao meio e as placas incubadas sob atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Colônias foram confirmadas após ressuspensão em 100 µL de água ultra-pura estéril, fervura por 10 minutos e o DNA amplificado por técnica de PCR espécie-específico para cada agente (Appuhamy et al., 1998; Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010).

A avaliação histopatológica foi realizada após processamento pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Foi feita a descrição morfológica das lesões e atribuído escore de lesões inflamatórias: 0 (ausência de alterações inflamatórias) a 3 (intensa).

Para confirmar a presença do agente em lesões histopatológicas, cortes com alterações histológicas foram processados para imuno-histoquímica. Nessa técnica, os cortes parafinizados foram hidratados e incubados com peróxido de hidrogênio a 10% (em PBS) por 30 minutos. Após serem lavadas com PBS, as lâminas foram transferidas para a câmara úmida a temperatura ambiente e incubadas com leite desnatado (25 mg/mL) por 45 minutos e

posteriormente incubadas com o anticorpo primário por 30 minutos. O soro hiper-imune produzido conforme descrito abaixo foi utilizado como o anticorpo primário, na diluição de 1:1000, para a pesquisa dos dois agentes. Após, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário por 20 minutos, depois lavadas com PBS e incubadas por 20 minutos com o complexo estreptoavidina-peroxidase (LSAB kit, Dako, EUA). A imunomarcação foi revelada com cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, EUA) e os cortes contracorados com hematoxilina de Mayer (Silva et al., 2011).

Os anticorpos primários policlonais (soro hiperimune anti-*A. seminis* e anti-*H. somni*) utilizados foram produzidos em coelhos, mantidos em gaiolas isoladas no Hospital Veterinário da UFMG, alimentados com ração comercial para coelhos, verduras e água à vontade. Estes foram submetidos à imunoestimulação com injeções intramusculares semanais de 1 mL de suspensão contendo  $1,0 \times 10^9$  UFC de *A. seminis* ou *H. somni*, diluídos em Adjuvante de Freund Incompleto (Sigma-Aldrich, EUA). Os coelhos foram estimulados uma vez por semana, totalizando quatro injeções, e a produção de anticorpos foi acompanhada semanalmente por teste de soro-aglutinação. Uma semana após a última inoculação, os coelhos foram submetidos à coleta de sangue total, sob anestesia (xilazina 10 mg/Kg e quetamina 40 mg/Kg) seguida de punção intracardíaca com agulha de 40 x 1,6 mm. Todo soro extraído de cada animal foi alíquotado em microtubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

No entanto, apesar de utilizadas a mesma técnica de produção de anticorpos e processamento das lâminas, o método de imuno-histoquímica utilizado foi eficiente apenas para a marcação de *A. seminis*.

#### **Análise estatística**

Dados que apresentaram distribuição normal (circunferência escrotal, comprimento e largura testicular) foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett de múltiplas comparações. Dados não paramétricos (consistência testicular, comprimento e largura caudas dos epidídimos) foram analisados por Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas. As frequências de amostras positivas para *A. seminis* e *H. somni* foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Foi considerada diferença estatística quando  $P < 0,05$ . As análises foram feitas com o programa GraphPad InStat, versão 3.05 (GraphPad InsStat Software, Inc. San Diego, EUA).

## **RESULTADOS**

### **Achados clínicos**

Imediatamente antes da infecção experimental (Tempo 0), todos os carneiros utilizados nas duas infecções experimentais apresentavam-se clinicamente saudáveis, sem lesões palpáveis em testículos ou epidídimos. Além disso, todos os animais foram negativos para infecção por *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* por cultura bacteriológica de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial, assim como negativos para infecção por *B. ovis* por IDGA.

Durante todo o período experimental, não houve alteração da circunferência escrotal nos dois grupos experimentais (Figura 1). No entanto, a consistência testicular diminuiu aos 35 dpi nos animais infectados por *A. seminis*, enquanto que o grupo infectado por *H. somni* apresentou diminuição da consistência testicular já aos 21 dpi (Figura 2). A consistência testicular de ambos os grupos de carneiros infectados permaneceu reduzida até o final do período experimental.

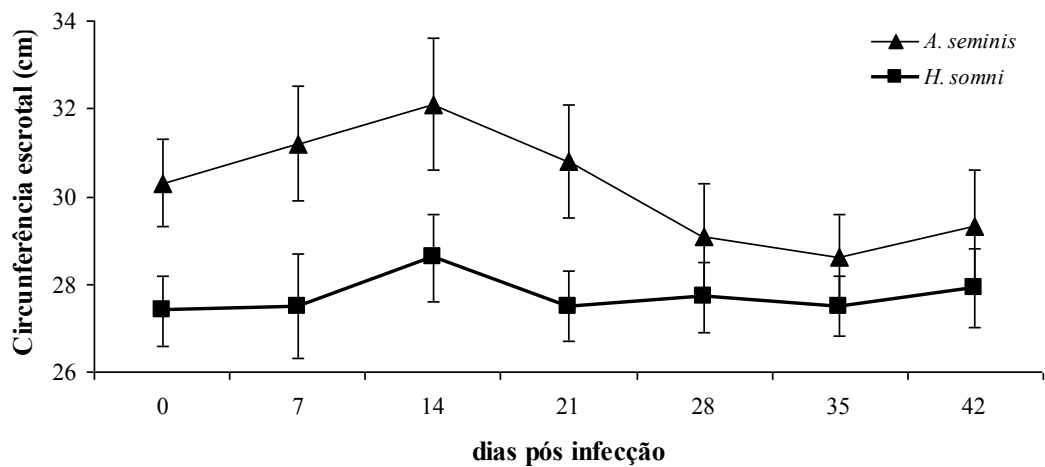


Figura 1. Circunferência escrotal de carneiros experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis* (n=10) ou *Histophilus somni* (n=10) durante 42 dias de infecção. Os valores de cada ponto representam média e erro padrão.

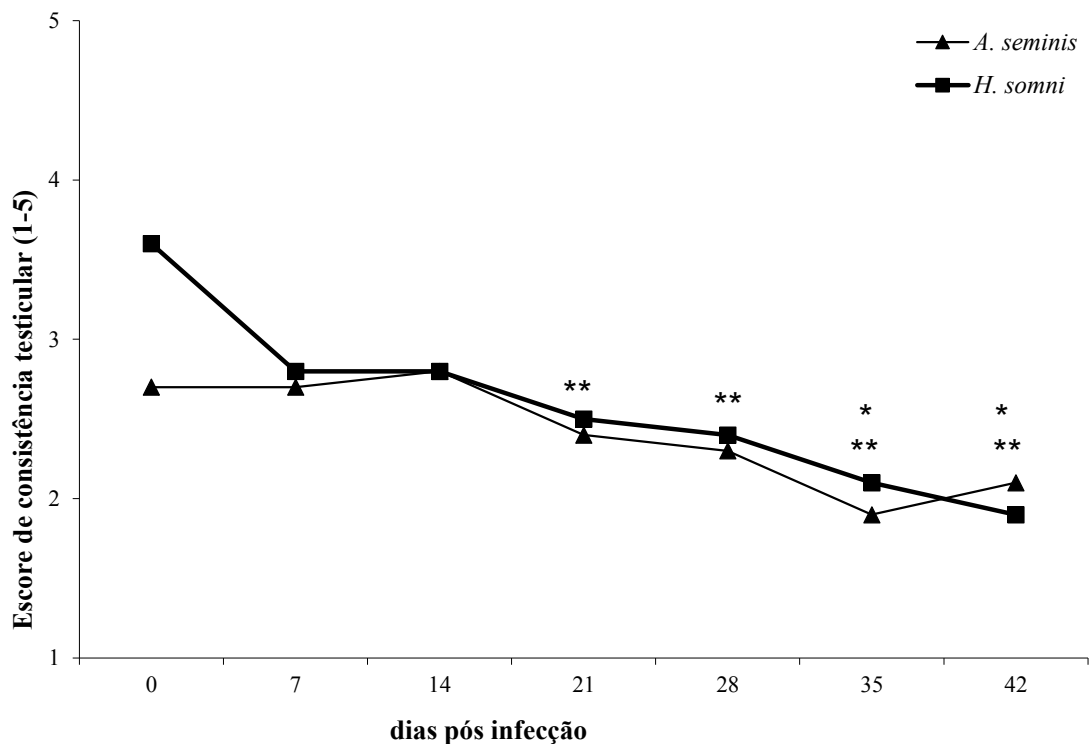


Figura 2. Consistência testicular de carneiros experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis* (n=10) ou *Histophilus somni* (n=10) durante 42 dias de infecção. Os valores de cada ponto



representam média. Asteriscos indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos valores pré-infecção (Tempo 0) pelo teste de Dunn de múltiplas comparações (\* infecção por *A. seminis*; \*\* infecção por *H. somni*).

Não houve diferença entre a média das medidas dos testículos direitos e esquerdos dentro de cada grupo experimental e, portanto, os valores apresentados são referentes à média de ambos os testículos de 10 animais por grupo (Figura 3). A infecção por *A. seminis* não causou alteração nas

medidas testiculares em nenhum momento do período experimental. Por outro lado, a infecção por *H. somni* resultou em redução pontual do comprimento testicular aos 28 dpi e aumento da largura testicular já aos 7 dpi (Figura 3). A largura testicular média permaneceu aumentada durante todo o período experimental.

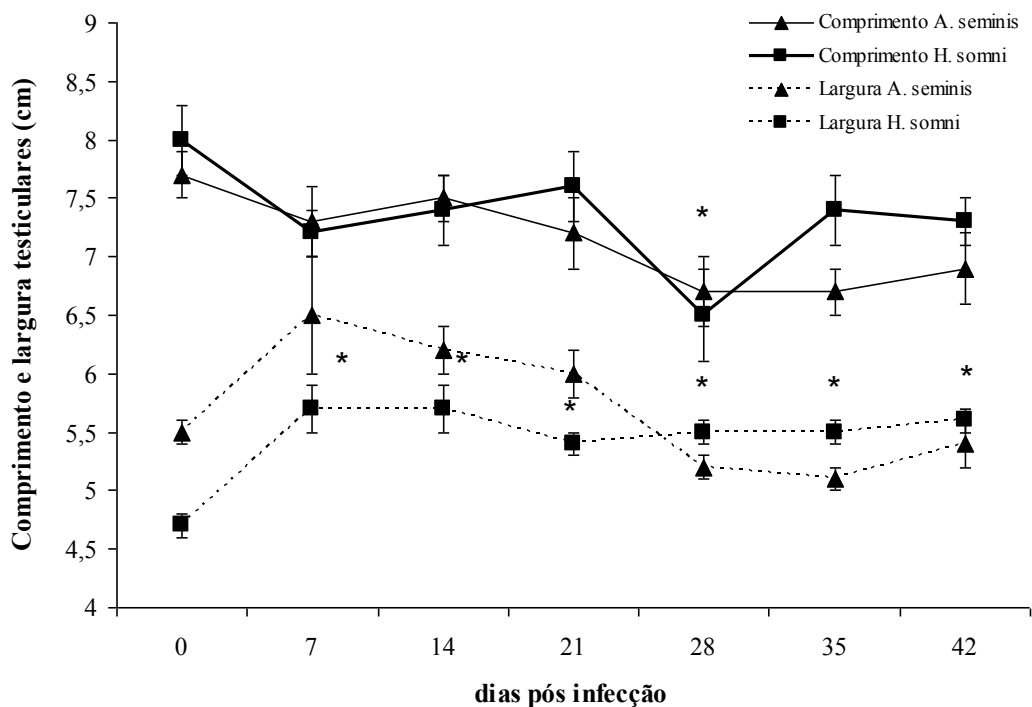


Figura 3. Comprimento e largura testiculares de carneiros experimentalmente infectados por *Actinobacillus seminis* ou *Histophilus somni* durante 6 semanas de infecção. Pontos representam média e erro padrão de 10 animais para cada grupo. (\*) indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Dunnet de múltiplas comparações, para infecção por *H. somni* em relação ao valor pré-infecção (tempo 0).

As medidas das caudas dos epidídimos direitos permaneceram inalteradas durante todo o curso das duas infecções experimentais (Figura 4). No entanto, as medidas das caudas dos epidídimos

esquerdos (i.e. sítio de inoculação) aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ) já aos 7 dpi em ambas as infecções. Na infecção por *A. seminis*, o comprimento das caudas dos epidídimos esquerdos

permaneceu aumentado até 28 dpi, retornando ao valor pré-inoculação aos 35 dpi, e depois aumentando novamente aos 42 dpi (Figura 4A), enquanto a largura permaneceu aumentada até 21 dpi, retornando para os valores originais aos 28

dpi (Figura 4B). Por outro lado, durante a infecção por *H. somni*, o comprimento e largura das caudas dos epidídimos esquerdos retornaram ao tamanho pré-infecção aos 21 dpi (Figura 4A e B).

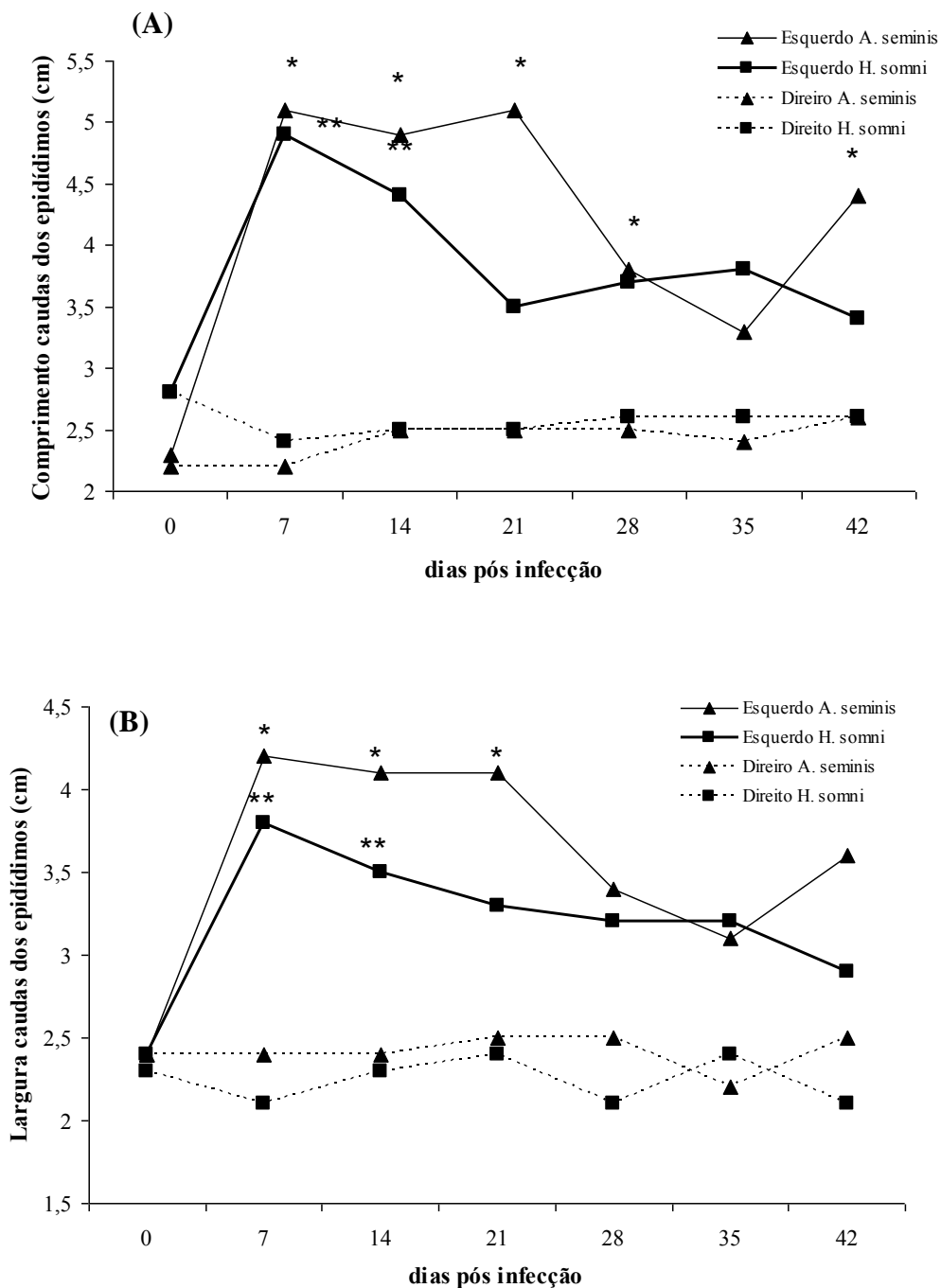


Figura 4. Comprimento (A) e largura (B) das caudas dos epidídimos de carneiros experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis* (n=10) ou *Histophilus somni* (n=10) durante o curso das infecções. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor pré-inoculação (tempo 0) pelo teste de Dunn de múltiplas comparações. (\*infecção por *A. seminis*; \*\* infecção por *H. somni*).

### **Isolamento bacteriano**

A inoculação experimental por *A. seminis* foi suficiente para resultar em infecção em todos os carneiros, a bactéria foi recuperada em amostras de todos os animais, no isolamento bacteriano, em pelo menos um momento da infecção. Por outro lado, a inoculação por *H. somni* resultou em infecção em oito dos 10 carneiros. A

frequência de animais positivos na bacteriologia ao longo dos períodos experimentais está apresentada na Figura 5. Já na primeira semana após a inoculação foi possível a recuperação de ambas as bactérias em amostras de sêmen, urina e lavado prepucial (Figura 5). Não houve recuperação de *A. seminis* e *H. somni* em amostras de sangue.

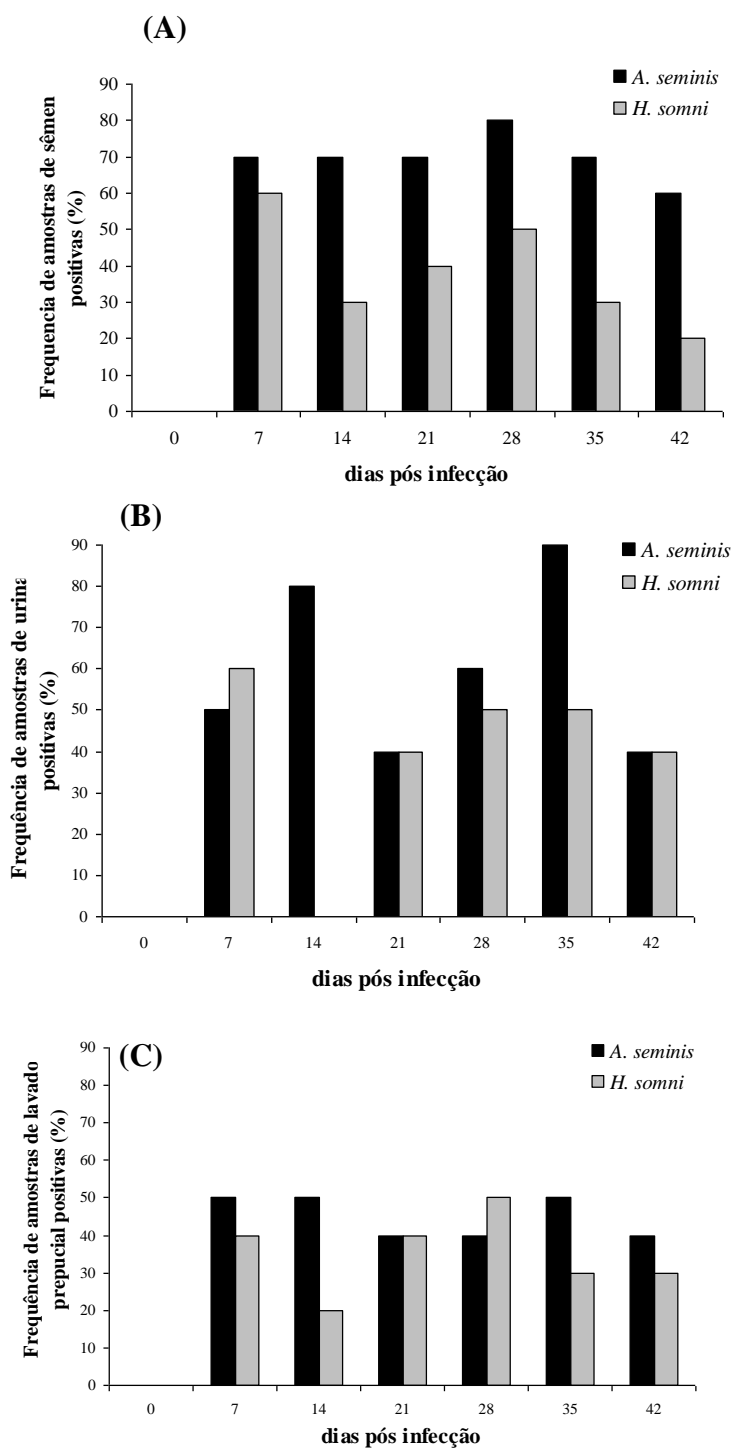


Figura 5. Frequência (%) de carneiros positivos por isolamento bacteriano para *Actinobacillus seminis* (n=10) ou *Histophilus somni* (n=10) ao longo de 42 dias de infecção experimental. (A) sêmen; (B) urina; (C) lavado prepucial.

A detecção de *A. seminis* em amostras de sêmen e de urina foi maior ( $P < 0,05$ ) que a

detecção de *H. somni* (Tabela 1). Por outro lado, *H. somni* foi isolado em número maior

de tecidos quando comparado ao isolamento de *A. seminis* ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1. Frequência (%) absoluta e relativa de isolamento de *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* em amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiros experimentalmente infectados ao longo de seis semanas de infecção.

Amostra	<i>Actinobacillus seminis</i>	<i>Histophilus somni</i>
Sêmen	70,0% (42/70) <sup>a</sup>	38,3% (23/70) <sup>b</sup>
Sangue	0,0% (0/70) <sup>a</sup>	0,0% (0/70) <sup>a</sup>
Urina	60,0% (36/70) <sup>a</sup>	40,0% (24/70) <sup>b</sup>
Lavado prepucial	45,0% (27/70) <sup>a</sup>	35,0% (21/70) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha, resultados diferem entre si pelo teste exato de Fisher ( $P < 0,05$ ).

Nas infecções por *A. seminis* e *H. somni*, sete (7/10) e cinco (5/10) carneiros, respectivamente tiveram pelo menos um órgão positivo na bacteriologia. *A. seminis* foi recuperado principalmente das ampolas dos ductos deferentes (60%) e bexiga (50%), na infecção por *H. somni* os órgãos com maior percentual de amostras positivas foram as vesículas seminais esquerdas (50%, Figura 6A) e bexigas (40%) (Figura 7).

Interessantemente, a recuperação de ambos os agentes no sítio de inoculação foi baixa, com 40% e 10% de caudas de epidídimo, esquerdas e direitas respectivamente, positivas para *A. seminis* e nenhuma cauda positiva para *H. somni*. A infecção por *H. somni* resultou em 30% de rins positivos (Figura 6B). Não houve recuperação dos agentes em amostras de baço, fígado, linfonodos inguinais e ilíacos.

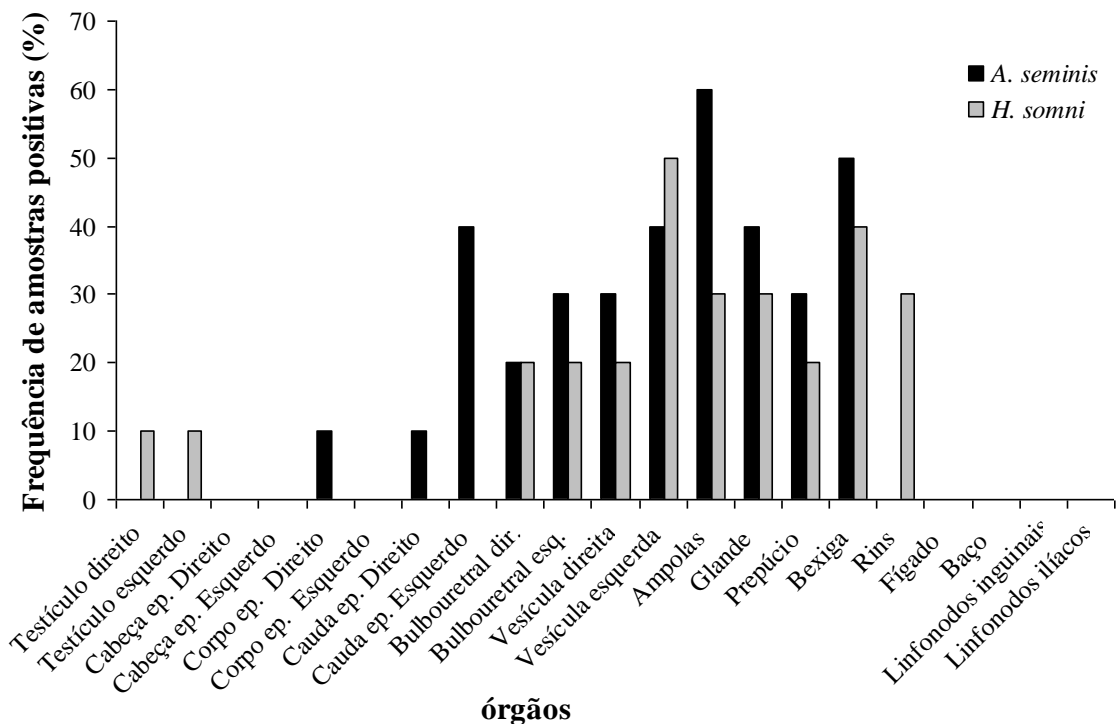


Figura 6. Frequência (%) de detecção de *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* por bacteriologia de tecidos de carneiros experimentalmente infectados após seis semanas de infecção.

### Alterações anatomo-histopatológicas

A inoculação intraepididimária com *A. seminis* resultou em lesões macroscópicas localizadas apenas no sistema reprodutivo dos carneiros. As alterações observadas com maior frequência foram abscessos no epidídimo (7/10), aumento do volume de linfonodos inguinais (6/10) e ilíacos (5/10). Seis carneiros apresentaram abscessos na cauda do epidídimo esquerdo (sítio de inoculação) (Figura 7A e B) e apenas um carneiro apresentou abscesso na cauda do epidídimo direita. Abscessos variaram de 0,5 a 5,0 cm de diâmetro. O testículo esquerdo de quatro (4/10) carneiros apresentava-se com tamanho e consistência reduzidos, e um carneiro apresentou atrofia testicular

esquerda associada à fibrose difusa da túnica vaginal (Figura 7C). Também foi observado o espessamento de túnica vaginal (4/10), aumento de glândulas vesiculares (3/10), além do aumento de glândula bulbouretral esquerda em um carneiro. Houve periorquite fibrinosa em dois carneiros. Um carneiro apresentou fibrose na cabeça do epidídimo esquerdo e, em outro, fibrose na cauda esquerda. Um carneiro apresentou edema na bolsa escrotal, adjacente à cauda do epidídimo esquerdo. Também foi observado material purulento e hemorragia em torno da cauda do epidídimo esquerdo em um carneiro (Figura 7D).

Da mesma forma que o observado para *A. seminis*, os carneiros inoculados com *H.*

*somni* apresentaram alterações macroscópicas restritas ao trato genital. As principais lesões observadas no trato reprodutivo foram espessamento e aderência fibrosa da túnica albugínea com a túnica vaginal (6/10) e aumento de volume e abscessos na cauda do epidídimo esquerdo (5/10, Figura 8A), sendo em um carneiro associado a hematoma na túnica vaginal adjacente (1/10, Figura 8B). Também foram observados abscessos no corpo do epidídimo esquerdo (4/10, Figura 8C), deposição de fibrina no plexo pampiniforme (3/10) e nos

testículos (3/10). Em cinco carneiros (5/10) foram observadas aderências multifocais entre testículos e túnica vaginal (Figura 8D). Também se observaram aderências entre cauda do epidídimo esquerda e túnica vaginal (2/10), testículo esquerdo com tamanho e consistência reduzidos (1/10), glândulas bulbouretrais diminuídas de tamanho e com consistência firme (1/10). Adicionalmente, foi observado aumento moderado dos linfonodos inguinais ou ilíacos esquerdos (2/10).

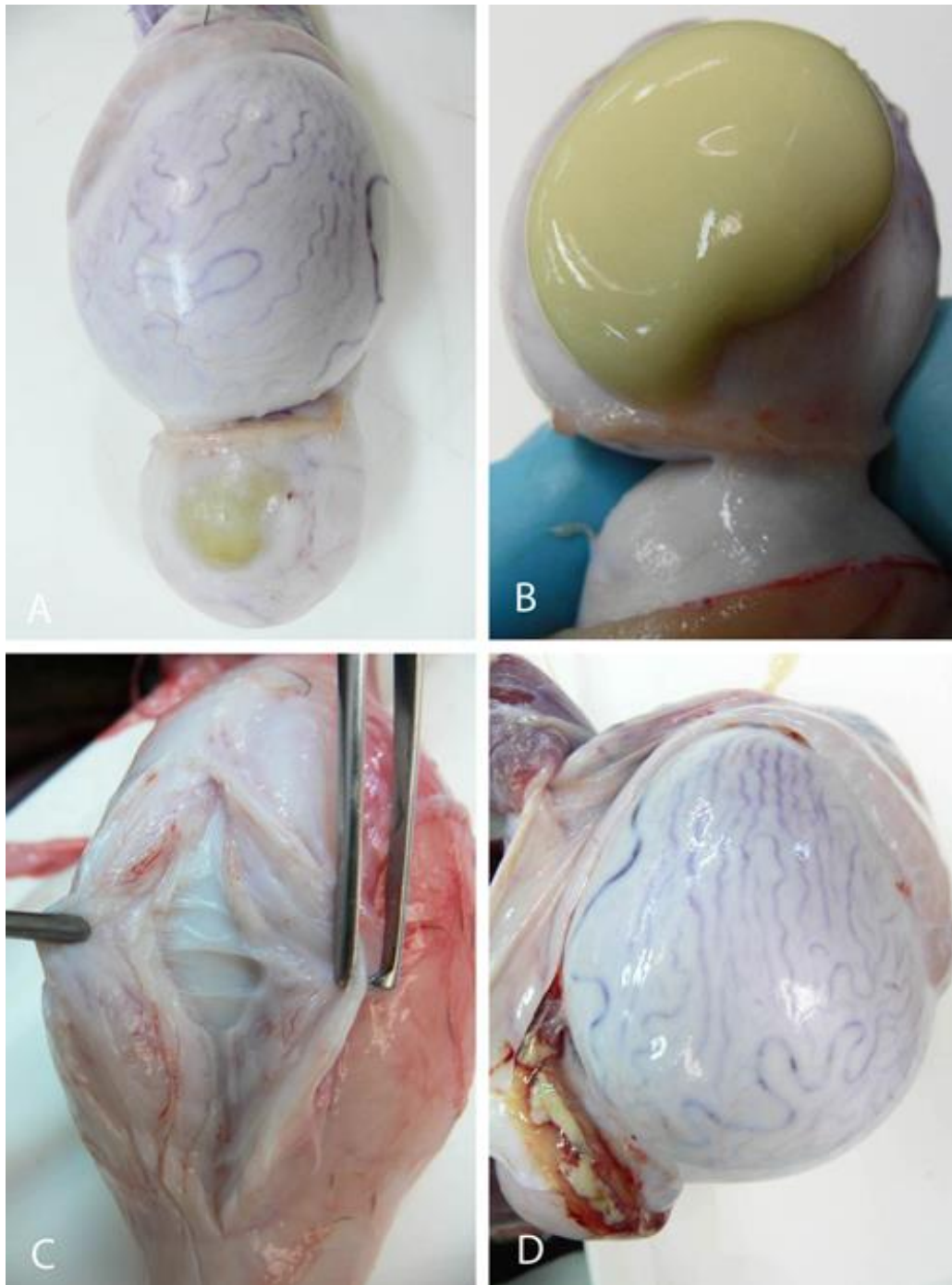


Figura 7. Carneiros experimentalmente infectados por *Actinobacillus seminis*. (A e B) Abscesso epididimário. (A) Cauda do epidídimo esquerdo intensamente aumentado de volume com área focal elevada de coloração amarelada e (B) ao corte preenchido por fluido viscoso amarelado (purulento). (C) Atrofia testicular associada à fibrose difusa da túnica vaginal. Testículo esquerdo diminuído de volume e túnica vaginal espessada e firmemente aderida ao testículo. (D) Epididimite purulenta. Cauda do epidídimo circundada de material purulento associado à hemorragia.



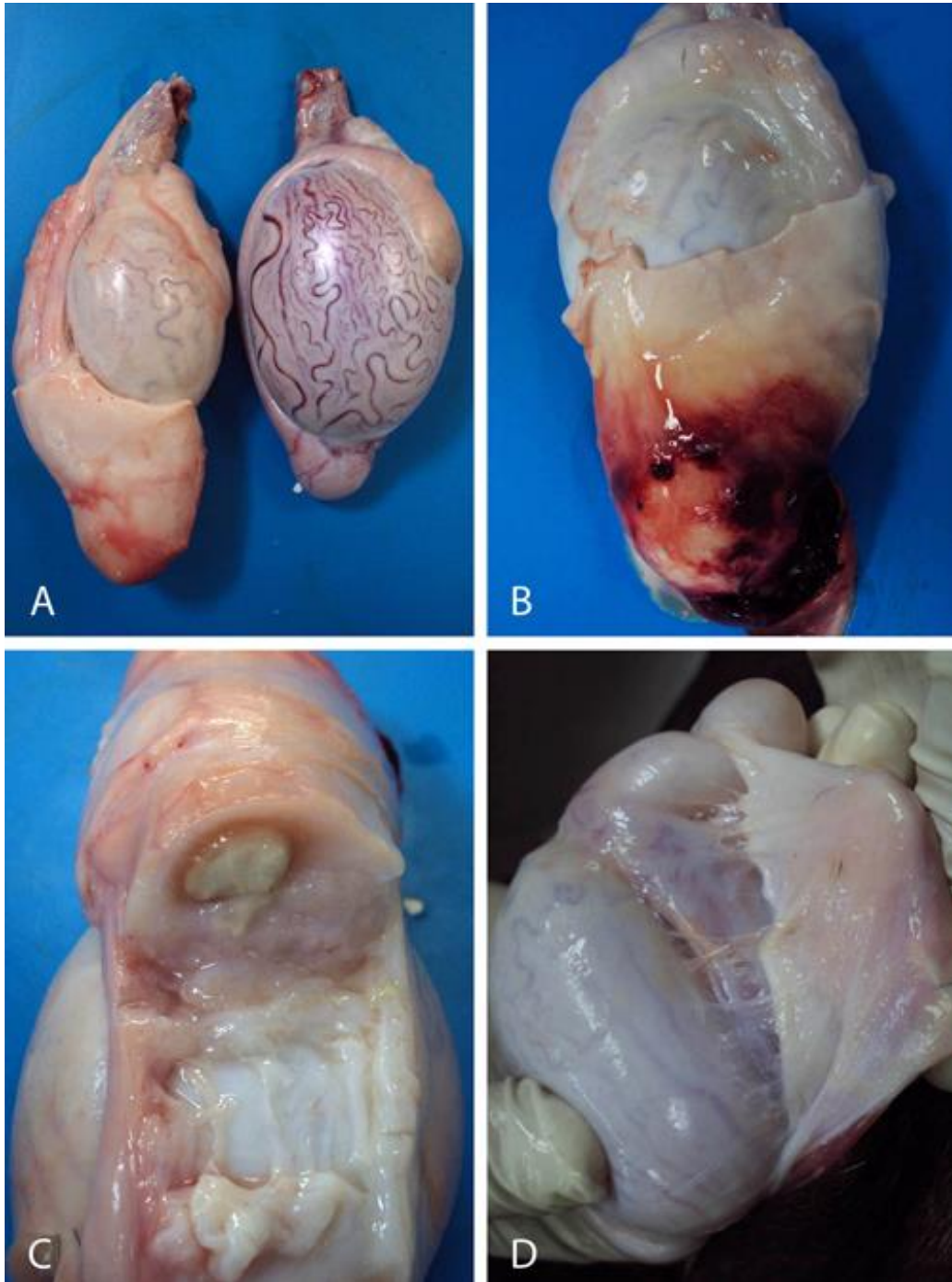


Figura 8. Carneiros experimentalmente infectados por *Histophilus somni*. (A e B) Epididimite associada à atrofia testicular. Corpo e cauda de epidídimo esquerdo com intenso aumento de volume, túnica vaginal aderida e testículo ipsilateral intensamente diminuído de volume. (B) Hematoma na túnica vaginal na região adjacente à cauda do epidídimo esquerdo. (C) Abscesso epididimário. Corpo do epidídimo esquerdo com intenso aumento de volume, espessamento da parede e ao corte área focal com material viscoso amarelado. (D) Periorquite crônica. Aderências multifocais entre testículo e túnica vaginal.

Os tecidos examinados histologicamente foram: cabeça, corpo e cauda do epidídimo direito e esquerdo, testículo direito e esquerdo, vesícula seminal direita e esquerda, glândula bulbo uretral direita e esquerda, ampolas, glândula, prepúcio, bexiga, rim, baço, fígado, linfonodo inguinal e linfonodo ilíaco interno, totalizando 21 tecidos por carneiro. Alterações histopatológicas foram semelhantes entre as duas infecções experimentais, sendo observadas em 24,1% (49/203) dos tecidos avaliados de carneiros infectados com *A. seminis* e em 28,7% (60/209) dos tecidos dos carneiros infectados com *H. somni*.

As lesões histológicas observadas nos grupos experimentais *A. seminis* e *H. somni* estão representadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A técnica de imunohistoquímica utilizada não foi eficaz para a imunomarcação anti-*H. somni* nos tecidos avaliados e assim estão representadas apenas as imunomarcações anti-*A. seminis*.

Na cauda do epidídimo foram observados: infiltrado linfo-histio-plasmocitário intersticial (Figura 9A) multifocal a difuso crônico, hiperplasia do epitélio ductal, infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Figura 10A), cistos intra-epiteliais (Figura 10B), infiltrado neutrofílico (microabscessos) ou misto intra-epitelial e/ou intra-luminal. Também foram observados piogranulomas formados por neutrófilos, macrófagos, macrófagos epitelióides e/ou células gigantes multinucleadas, com área central de necrose contendo espermatozóides e/ou bactérias imunomarcadas (Figura 9C e D). As lesões observadas no corpo do epidídimo foram: infiltrado mononuclear multifocal

intersticial ou perivascular e pequenos granulomas espermáticos (Figura 10C).

As lesões testiculares foram caracterizadas por degeneração (Figura 9B), no grupo experimental *A. seminis* havia 4/10 carneiros com degeneração testicular do lado esquerdo, escore médio 0,9 e no grupo experimental *H. somni* havia 5/10 animais afetados, escore médio 0,9).

Na vesícula seminal, observou-se infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário multifocal intersticial, infiltrado neutrofílico intra-epitelial e infiltrado neutrofílico e histiocitário intra-luminal (Figura 9E), com imunomarcação dentro de citoplasma de macrófagos no lume glandular (Figura 9F). Nas ampolas dos ductos deferentes foram observados infiltrado inflamatório intraluminal e intersticial difuso (Figura 10D), infiltrado intersticial plasmocitário discreto a intenso e intraepitelial ou intraluminal neutrofílico multifocal e hiperplasia glandular.

Observou-se na mucosa prepucial infiltrado plasmocitário multifocal discreto a moderado na submucosa e microabscessos intraepiteliais. Na bexiga foi observado e infiltrado linfo-histiocitário multifocal discreto na mucosa e infiltrado linfocítico perivascular multifocal discreto na submucosa. Dentre os órgãos linfóides avaliados, linfonodo inguinal, ilíaco e baço, hiperplasia linfóide foi a alteração mais frequente nos dois grupos. A distribuição, frequência e intensidade das alterações inflamatórias estão sumarizadas nas Tabelas 2 e 3.

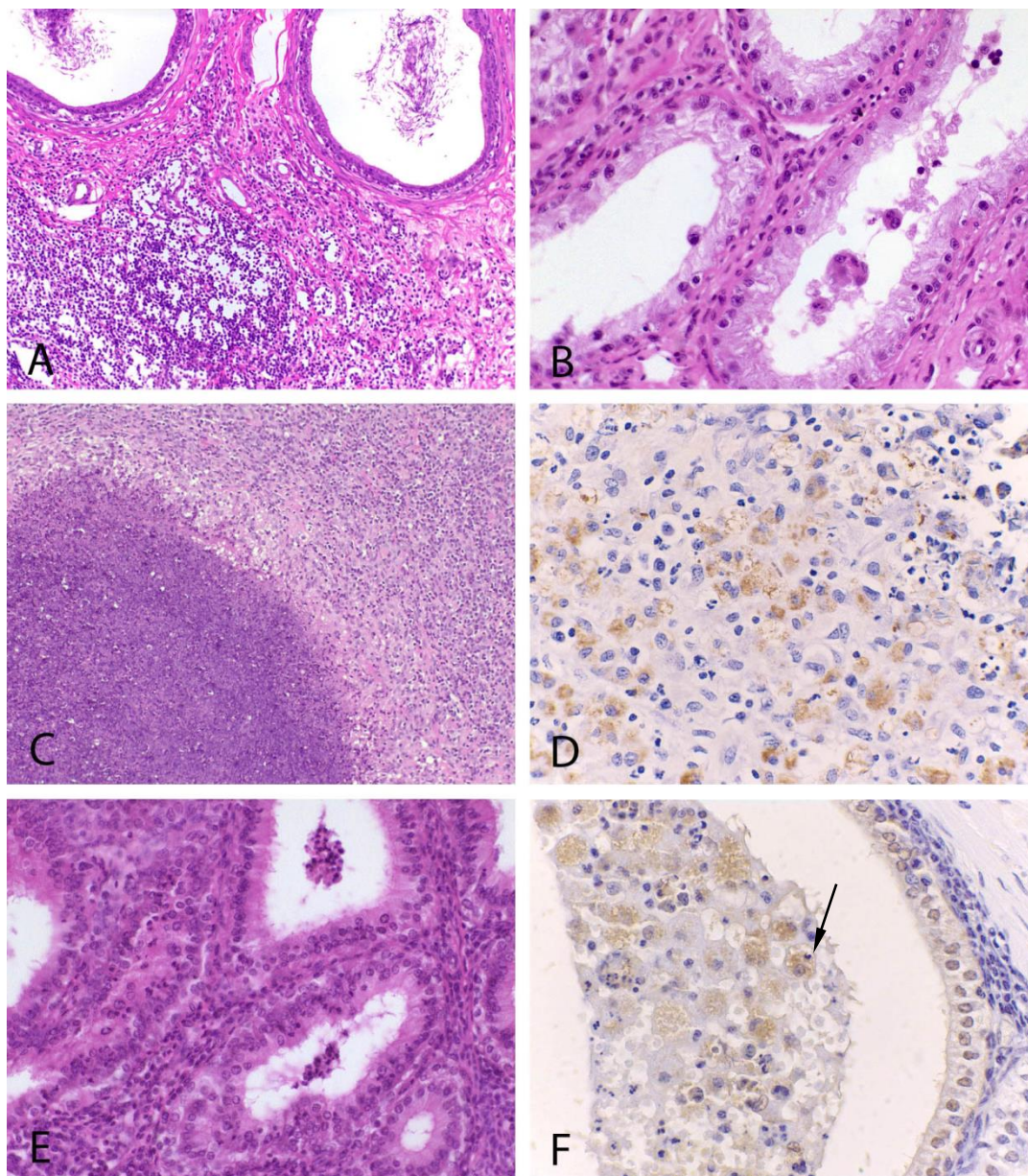


Figura 9. Carneiros experimentalmente infectados por *Actinobacillus seminis*. (A) Cauda de epidídimo, infiltrado linfo-histio-plasmocitário intersticial intenso focal. HE 200X. (B) Testículo, degeneração intensa com redução das camadas do epitélio seminífero, Bouin 400X (C) Cauda epidídimo, granuloma espermático, HE 200X. (D) Cauda de epidídimo, imunomarcção livre e em citoplasma de células inflamatórias do granuloma, Spretavidina-peroxidase 600X. (E) Vesícula seminal, infiltrado inflamatório intersticial e intraluminal, HE 400X. (F) Vesícula seminal, imunomarcção dentro de citoplasma de macrófagos no lume glandular (seta), Spretavidina-peroxidase 600X.



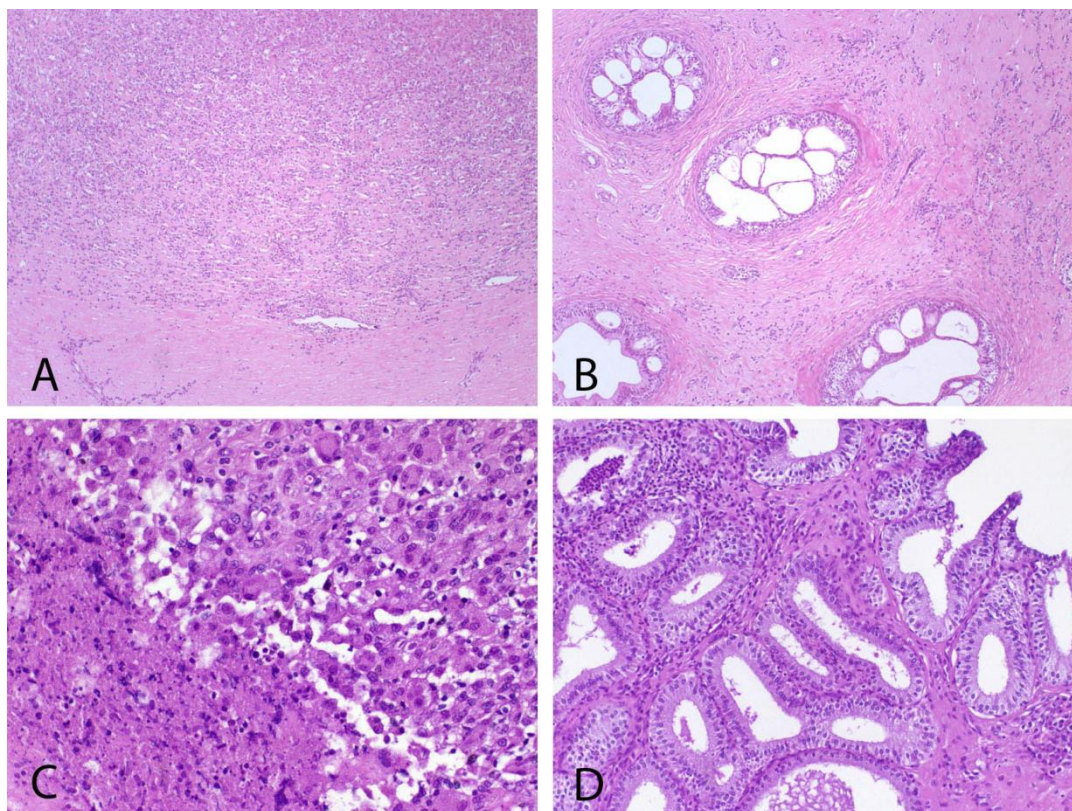


Figura 10. Carneiros experimentalmente infectados por *Histophilus somni*. (A) Cauda do epidídimo, infiltrado inflamatório mononuclear difuso, HE 100X. (B) Cauda do epidídimo, múltiplos cistos no epitélio epididimário e infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, HE 100X. (C) Corpo do epidídimo, granuloma espermático, HE 400X. (D) Ampola do ducto deferente, infiltrado inflamatório intraluminal e intersticial difuso, HE 200X.

Tabela 2. Distribuição, frequência e intensidade de lesões inflamatórias em órgãos de carneiros experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis*.

<b>Tecido</b>	<b>Cb E</b>	<b>Cb D</b>	<b>Co E</b>	<b>Co D</b>	<b>Cd E</b>	<b>Cd D</b>	<b>VS E</b>	<b>VS D</b>	<b>Bu E</b>	<b>Bu D</b>	<b>Am p</b>	<b>Bex</b>	<b>Ri m</b>	<b>Pr e</b>	<b>Gla</b>	<b>Lil</b>	<b>Lin</b>	<b>Baç o</b>
Animais	1/10	0/10	4/9	0/10	9/9	1/10	5/9	1/10	1/10	0/10	5/10	5/1 0	1/10	6/7	0/1 0	0/1 0	0/1 0	3/10
Mediana *	0,2	0,1	1,0	0,1	2,4	0,3	1,4	0,3	0,2	0,1	1,1	0,6	0,3	1,4	0,1	0,0	0,0	0,5

\*Score da lesão inflamatória 0=ausente, 1=discreto, 2=moderado, 3=intenso. Cb= Cabeça epidídimo, Co= Corpo do epidídimo, Cd= Cauda do epidídimo, VS= Vesícula seminal, Bu= Bulbouretral, Amp= Ampolas, Bex= Bexiga, Pre= Prepúcio, Gla= Glande, Lil= Linfonodo ilíaco, Lin= Linfonodo inguinal, E= esquerdo, D=direito.

Tabela 3. Distribuição, frequência e intensidade de lesões inflamatórias em órgãos de carneiros experimentalmente infectados com *Histophilus somni*.

<b>Tecido</b>	<b>Cb E</b>	<b>Cb D</b>	<b>Co E</b>	<b>Co D</b>	<b>Cd E</b>	<b>Cd D</b>	<b>VS E</b>	<b>VS D</b>	<b>Bu E</b>	<b>Bu D</b>	<b>Am p</b>	<b>Bex</b>	<b>Ri m</b>	<b>Pr e</b>	<b>Gla</b>	<b>Lil</b>	<b>Lin</b>	<b>Baç o</b>
Animais	2/10	3/10	5/10	0/10	9/10	0/10	6/10	0/10	3/10	2/10	5/10	4/1 0	2/10	9/9	3/1 0	1/1 0	1/1 0	2/10
Mediana *	0,2	0,4	1,0	0,0	2,1	0,1	1,4	0,2	0,6	0,6	1,1	0,6	0,3	1,6	0,4	0,2	0,2	0,3

\*Score da lesão inflamatória 0=ausente, 1=discreto, 2=moderado, 3=intenso. Cb= Cabeça epidídimo, Co= Corpo do epidídimo, Cd= Cauda do epidídimo, VS= Vesícula seminal, Bu= Bulbouretral, Amp= Ampolas, Bex= Bexiga, Pre= Prepúcio, Gla= Glande, Lil= Linfonodo ilíaco, Lin= Linfonodo inguinal, E= esquerdo, D=direito.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo comparativo realizado entre as infecções por *A. seminis* e *H. somni*, trazendo informações importantes para o melhor entendimento sobre sua patologia e servindo como subsídio para estudos relacionados a seu diagnóstico em ovinos. Apesar de ambos os agentes serem encontrados na microbiota prepucial de carneiros saudáveis (Burgess, 1982; Walker e Leamaster, 1986), neste trabalho foi demonstrado que os dois microrganismos são igualmente capazes de causar lesões no trato reprodutivo de ovinos experimentalmente inoculados.

Mesmo com a inoculação sendo via intra-epididimária, ambos agentes causaram infecção em diferentes órgãos do trato genito-urinário, chegando a colonizar bexigas, glândulas bulbouretrais, vesículas seminais, ampolas dos ductos deferentes e, no caso de *H. somni*, os rins e testículos. Entretanto, nenhum dos dois agentes apresentou dispersão via hematogena, uma vez que não foram isolados em amostras de baço, fígado, linfonodos inguinais e ilíacos, além de não ter ocorrido bacteremia detectável em nenhum momento durante as duas infecções experimentais.

As lesões macro e microscópicas mais intensas foram encontradas no sítio de inoculação (i.e. cauda do epidídimo esquerdo). Para ambos os agentes, além dos epidídimos, os tecidos com reações inflamatórias mais intensas foram as vesículas seminais esquerdas, ampolas dos ductos deferentes e prepúcio.

Carneiros inoculados com *A. seminis* por via intra-epididimária, também podem apresentar vesiculite, ampolite e bulbouretrite (Al katib e Dennis, 2007). No entanto, no presente estudo, mesmo sendo isolados das bulbouretrais, *A. seminis* e *H. somni* não produziram reações inflamatórias evidentes nesse órgão.

Dentre os principais achados clínicos, pode-se destacar a acentuada diminuição da consistência testicular observada nos dois grupos experimentais, que foi associado histologicamente à degeneração testicular. Em alguns cortes histológicos o quadro de degeneração foi tão acentuado que foram observados túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli, o que impacta diretamente a fertilidade do animal. As alterações testiculares e epididimárias causadas pela inoculação por *A. seminis* já podem ser notadas 24 horas após a inoculação (Al Katib e Dennis, 2008). Decorrida uma semana, as alterações são ainda mais perceptíveis ao exame clínico. Por outro lado, em casos crônicos, a consistência testicular pode aumentar de maneira irreversível como reflexo de atrofia e fibrose intersticial (Al Katib e Dennis, 2007; Bezerra et al., 2012). A ausência de reação inflamatória nos testículos e o isolamento bacteriano apenas no grupo infectado por *H. somni*, em apenas dois testículos (2/20), juntamente com a falta de imunomarcagem para ambos os agentes, pode ser indicativo de que ambas as bactérias comprometam os testículos de forma secundária, como reflexo da inflamação dos epidídimos.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre o tamanho médio dos testículos direito e esquerdo, um carneiro infectado por *H. somni* apresentou intensa redução do comprimento testicular esquerdo e aumento do comprimento e largura da cauda do epidídimo ipsilateral, que refletiram em acentuada assimetria facilmente detectável ao exame clínico. O aumento do comprimento e largura das caudas dos epidídimos observados já na primeira semana após a inoculação, nos dois grupos experimentais, estão de acordo com outros estudos (Al Katib e Dennis, 2008) e são compatíveis com processo inflamatório agudo. Nos dois grupos experimentais, a largura das caudas dos epidídimos tenderam

a voltar aos valores normais entre a terceira e quarta semana após a inoculação.

No geral, os achados anatomo-patológicos foram semelhantes aos observados em casos de infecção natural (Claxton e Everett, 1966; Low e Grahan, 1985; Bezerra et al., 2012), para ambas as infecções experimentais.

A excreção dos agentes ocorreu de forma intermitente, em todas as amostras biológicas testadas, corroborando com os achados de diversos estudos (Laws et al., 1972; Webb et al., 1980; Worthington et al., 1985; West e Bruce, 1991; Xavier et al., 2010).

A baixa frequência de isolamento bacteriano em amostras de cauda de epidídimo sugere a cronificação das infecções, que dificultou o isolamento bacteriano dos dois agentes (Bezerra, 2012).

A maior frequência de detecção de *A. seminis* do que *H. somni* em amostras de urina foi compatível com o maior número de bexigas positivas para *A. seminis* por isolamento bacteriano. Ficou confirmado que *A. seminis* e *H. somni* podem sobreviver também no trato urinário, sendo a urina uma importante fonte de eliminação dos agentes causadores de epididimite, o que reforça seu uso para fins de diagnóstico (Xavier et al., 2010; Costa et al., 2012).

### CONCLUSÃO

*A. seminis* e *H. somni* são capazes de causar infecção em ovinos, colonizando diferentes órgãos do trato genito-urinário, sendo indistinguíveis por exame clínico, necropsia ou histopatologia. Por outro lado, como as infecções são muito semelhantes, fica evidenciada a importância do uso de técnicas complementares de diagnóstico direto para confirmação do agente etiológico.

**CAPÍTULO III:  
PCR MULTIPLEX ESPÉCIE-  
ESPECÍFICO PARA O  
DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES  
POR *BRUCELLA OVIS*, *ACTINOBACILLUS  
SEMINIS* E *HISTOPHILUS SOMNI* EM  
CARNEIROS**

**INTRODUÇÃO**

A epididimite infecciosa ovina é causada principalmente pelas bactérias *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* (Burgess, 1982). *A. seminis* é componente da microbiota normal da mucosa prepucial de carneiros saudáveis que, sob condições de stress do hospedeiro, pode causar infecção ascendente levando a epididimite e orquite, particularmente em carneiros jovens (Burgess, 1982; Carvalho Júnior et al., 2010). A infecção por *A. seminis* frequentemente progride assintomaticamente durante os primeiros estágios, podendo não ser diagnosticada até que a doença esteja completamente instalada. *H. somni*, previamente descrito como *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* e *Histophilus ovis*, está naturalmente presente na mucosa prepucial de bovinos, caprinos e ovinos como componente da flora normal (Walker e Leamaster, 1986). Similarmente ao *A. seminis*, *H. somni* também pode agir como um patógeno oportunista, mas, além da epididimite, a infecção pode resultar em outras manifestações clínicas, como vaginite, pneumonia, meningoencefalite, mastite, sinovite, septicemia e outras desordens reprodutivas (Ward et al., 1995; Diaz-Aparicio et al., 2009). Em ovinos, essa bactéria causa infecção semelhante à brucelose ovina por *B. ovis* (Burgess, 1982; Walker e Leamaster, 1986), que é caracterizada por epididimite uni ou bilateral e orquite que estão associados à subfertilidade ou infertilidade, dependendo da intensidade das lesões.

As infecções por tais agentes geralmente são irresponsivas a antibioticoterapia (Heath et al., 1991), resultando em perdas econômicas significativas devido a falhas reprodutivas e descarte de reprodutores (Carpenter et al., 1987).

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é baseado em exame clínico, sorologia e bacteriologia de sêmen (Burgess, 1982; Santos et al., 2005). Diagnóstico molecular com amostras de sêmen, baseado na amplificação do DNA de *Brucella* spp., também pode ser utilizado (Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007). Além disso, foi desenvolvida recentemente a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) espécie-específica para o diagnóstico direto da infecção por *B. ovis* (Xavier et al., 2010). Testes sorológicos não estão disponíveis para o diagnóstico das infecções por *A. seminis* e *H. somni* e, dessa forma, o diagnóstico é comumente baseado em avaliação clínica e bacteriologia de sêmen, embora a PCR espécie-específica seja proposta atualmente como um método de diagnóstico alternativo (Appuhamy et al., 1998; Saunders et al., 2007).

Considerando a importância do diagnóstico diferencial, principalmente em estudos epidemiológicos ou programas de erradicação (Bricker, 2002), o objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar uma técnica de PCR multiplex, com iniciadores espécie-específicos, para detecção simultânea de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* em amostras biológicas de ovinos.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras

Para a realização do estudo, foram utilizadas 560 amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial, provenientes do estudo prévio descrito no Capítulo II, sendo 70 amostras de cada material biológico, das duas infecções experimentais. Fragmentos de cauda, corpo e cabeça de ambos os epidídimos, testículos, ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas bulbo-uretrais, linfonodos inguinais e ilíacos, prepúcio, glândula, bexiga, fígado, rins e bexiga, no total de 420 amostras, foram coletados após as infecções experimentais realizadas previamente (Capítulo II) e acondicionados em tubos de 50 mL contendo 2 mL de PBS estéril e macerados com o auxílio de homogeneizador e fragmentos adicionais acondicionados em tubos criogênicos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração de DNA.

Como controle negativo foram utilizadas amostras de sêmen (n = 37), sangue (n = 11), urina (n = 18) e lavado prepucial (n = 8) de carneiros clinicamente saudáveis, livres de *B. ovis* por sorologia (IDGA) e com histórico de fertilidade. Adicionalmente, amostras de epidídimos foram obtidas de carneiros clinicamente saudáveis (n = 20), provenientes de abatedouro local.

Para a avaliação da técnica de PCR multiplex, amostras biológicas de ovinos experimentalmente infectados por *B. ovis* foram obtidas de um estudo prévio (Xavier et al., 2010; Carvalho Júnior et al., 2012).

### Cultura bacteriológica

Para o isolamento de *A. seminis*, 100 µL de cada amostra (homogeneizados de tecidos, sêmen, sangue, urina e lavado prepucial) foram plaqueados em meio GC (meio base

do Agar chocolate, Bectron Dickinson, EUA), suplementado com 1% de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich, Brasil), sem antibióticos e incubadas a 37°C por 48h. Para a detecção de *H. somni*, 0,5% de extrato de levedura (Invitrogen, Brasil) foi adicionado ao meio e as placas incubadas sob atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Colônias foram confirmadas por PCR espécie-específico para cada agente (Appuhamy et al., 1998; Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010).

### Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método da proteinase K e fenol/clorofórmio como descrito previamente (Matrone et al., 2009). Brevemente, foram utilizados 0,5 mL de sangue e sêmen para a extração de DNA. A este volume, foram adicionados 0,5 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) seguido de repetidas centrifugações a 13.000 x g por 5 minutos (3 a 4 vezes) e descarte do sobrenadante, até que este ficasse translúcido. Após lavagens, o precipitado foi re-suspendido em tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl), com incubação em termobloco a 80°C por 10 minutos e depois acrescentados 50 µL de SDS a 10% (BioAgency, Brasil) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen, Brasil), seguidos de incubação a 37°C por 24h. Após a segunda incubação, foram adicionados 500 µL de fenol equilibrado (GE Healthcare, Brasil) seguido de centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos. Então, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL, seguido da adição de 400 µL de fenol-clorofórmio (1:1). As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos, seguida de transferência de 300 µL da fase aquosa para um novo microtubo de 1,5 mL e adição de 300 µL de álcool isopropílico. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas a -20°C por 12 a 18 horas. Para a precipitação do DNA, as

amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 minutos. O precipitado de DNA formado foi lavado com 1000 µL de etanol a 70% seguida de centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos. O precipitado final foi ressuspensionado em 30 µL de tampão TE e incubado a 56°C por 30 minutos. O material foi estocado a -20°C até a realização da PCR.

Amostras de urina e lavado prepucial foram congeladas e armazenadas a -20°C imediatamente após a coleta. Para a extração, foram descongelados 1,0 mL de cada amostra, nas quais foram adicionados 0,5 mL de tampão TE seguido de uma centrifugação a 13.000 x g por 15 minutos. O restante do procedimento foi semelhante ao descrito para sêmen e sangue.

Para a extração de DNA dos órgãos, os fragmentos armazenados em criotubos a -80°C foram descongelados e macerados com o auxílio de lâmina de bisturi estéril. O material foi suspenso em 0,8 mL de tampão TE e o restante do procedimento foi realizado da mesma forma que o descrito para amostras de sêmen e sangue, com exceção da ressuspensão do precipitado final, que foi em 200 µL de tampão TE.

Ao final de todas as extrações, a pureza e concentração de DNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria (SmartSpec, BioRad, EUA), medindo-se a densidade óptica a 260 nm para DNA e a 280 nm para proteínas.

### PCR simples

A PCR simples foi realizada utilizando iniciadores previamente descritos para detecção de *A. seminis* (Senso 5'-CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC-3' and Anti-senso 5'-AAGAAAAAGACGAAGAGACATT-3', Appuhamy et al., 1998) e *H. somni* (Senso 5'-GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3' e Anti-senso 5'-ACTCGAGCGTCAGTATCTTC-3',

Saunders et al., 2007). As reações de PCR foram realizadas utilizando 15 µL de PCR supermix comercial (Invitrogen, SP, Brasil), 10 µM de cada iniciador, e 1–3 µL de DNA-molde correspondente a 200–500 ng de DNA por reação. Os parâmetros de ciclagem foram os previamente descritos para cada alvo (Appuhamy et al., 1998; Saunders et al., 2007) e estão sumarizados na Tabela 4. Água ultra-pura estéril foi utilizada em substituição ao DNA-molde como controle negativo. DNA genômico extraído de culturas puras de *A. seminis* e *H. somni* foi utilizado como controle positivo. A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, SP, Brasil) a 1%, em cuba horizontal com tampão de corrida TBE (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0) 1X. As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) e foram consideradas positivas aquelas com o peso molecular esperado para cada par de iniciadores utilizado, sendo 436 e 313 pares de bases (pb) para *A. seminis* e *H. somni*, respectivamente.

### PCR multiplex

Para a PCR multiplex, foram utilizados iniciadores espécie-específicos previamente validados para detecção de *B. ovis* (Senso 5'-GCCTACGCTGAACTTGCTTTTG-3' and Anti-senso 5'-ATCCCCCATCACCATAACCGAAG-3'), os quais amplificam produto de 228 pb (Xavier et al., 2010). Os iniciadores para *A. seminis* e *H. somni* foram os mesmos utilizados para a PCR simples. Foi adicionado a reação 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e a temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C, resultando em produtos para os três alvos sem afetar a especificidade da amplificação.

As reações de PCR multiplex foram realizadas para um volume final de 31 µL, sendo 22 µL de PCR supermix (Invitrogen,

Brasil), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 µM de cada iniciador e 200-500 ng de DNA alvo. Os parâmetros de ciclagem foram 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 6 min. Os produtos de PCR

foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% (Invitrogen, Brasil). Os produtos amplificados foram 218 pb, 436 pb e 313 pb para *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, respectivamente.

Tabela 4. Condições de ciclagem utilizadas para a PCR simples e PCR multiplex para o diagnóstico das infecções por *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* em ovinos.

<b><i>Brucella ovis</i></b>			
Ciclos	Passo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	5 min
	Desnaturação	94°C	30s
30	Anelamento	60°C	30s
	Extensão	72°C	1 min e 30s
1	Extensão final	72°C	10 min

<b><i>Actinobacillus seminis</i></b>			
Ciclos	Passo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	4 min
	Desnaturação	94°C	30s
40	Anelamento	55°C	45s
	Extensão	72°C	45s
1	Extensão final	72°C	7 min

<b><i>Histophilus somni</i> e PCR multiplex</b>			
Ciclos	Passo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	2 min
	Desnaturação	94°C	30s
35	Anelamento	55°C	30s
	Extensão	72°C	1 min
1	Extensão final	72°C	6 min

#### **Sensibilidade e especificidade da PCR multiplex**

A sensibilidade da PCR multiplex foi avaliada através de reações contendo 0,2 ng, 2 ng, 20 ng e 200 ng de DNA genômico extraído de culturas puras de *B. ovis* (ATCC 25840), *A. seminis* (ATCC 15768) e *H. somni* (3384Y), resultando em 64

associações de diferentes concentrações de DNA de cada agente.

Para investigar possíveis influências da amostra biológica na eficiência de amplificação do DNA, amostras de sêmen que são a principal via de eliminação dos microrganismos causadores de epididimite foram contaminadas em diluição seriada de

suspensão bacteriana contendo de  $10^6$  a  $10^0$  UFC/mL de sêmen para cada agente. Adicionalmente, para confirmar a capacidade do ensaio de detectar os três agentes simultaneamente, três diferentes amostras positivas de cada infecção experimental foram misturadas e submetidas a extração de DNA e PCR multiplex conforme já descrito.

A especificidade da PCR multiplex foi testada com DNA genômico de espécies bacterianas que podem potencialmente causar epididimite em ovinos, incluindo *B. ovis* (ATCC 25840), *A. seminis* (ATCC 15768), *H. somni* (3384Y), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Manheimia haemolytica* (D0614057), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (D0507204) e *Arcanobacterium pyogenes* (D0602705) assim como microrganismos filogeneticamente relacionados a *B. ovis*, como o *Ochrobactrum anthropi* (ATCC 49188). As reações de PCR foram realizadas como já descrito.

### **Análise estatística**

A frequência de amostras positivas por PCR e bacteriologia foram comparadas pelo teste exato de Fisher utilizando o programa GraphPad InStat, versão 3.10 e diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . A concordância entre os métodos de diagnóstico foi avaliada pelo teste Kappa utilizando o programa GraphPad Quick Calcs.

## **RESULTADOS**

### **Infecção experimental por *Actinobacillus seminis***

A inoculação experimental por *A. seminis* resultou em infecção de todos os carneiros desafiados, uma vez que *A. seminis* foi detectado por PCR simples ou bacteriologia em pelo menos um momento do curso da infecção experimental em todos os carneiros

(Anexo I). No momento pré-inoculação (Tempo 0) oito (8/10) carneiros foram positivos para *A. seminis* por PCR simples em amostras de DNA extraídas de sêmen e dentre esses animais positivos, um (1/8) foi positivo para PCR de sangue e dois (2/8) para PCR de lavado prepucial. Nenhuma das amostras pré-inoculação foi bacteriologicamente positiva.

A frequência de detecção de *A. seminis* em sêmen e sangue por PCR foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) do que a frequência de positividade por cultivo bacteriano (Tabela 5). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre bacteriologia e PCR quando realizados em amostras de urina e lavado prepucial. Todas as amostras utilizadas como controle negativo foram negativas para *A. seminis* por ambas as técnicas (i.e. PCR e bacteriologia). Adicionalmente, a concordância entre as técnicas e os valores de Kappa foram melhores para amostras de sêmen e urina (Tabela 5).

A avaliação dos tecidos provenientes dos carneiros experimentalmente infectados demonstrou que 90% (9/10) deles foram positivos para a infecção por *A. seminis* tanto por bacteriologia quanto por PCR aos 45 dpi (Figura 11). *A. seminis* foi detectado em 17,2% (36/210) e 20,5% (43/210) de amostras de tecidos por bacteriologia e PCR, respectivamente. As ampolas dos ductos deferentes e a bexiga foram os órgãos com maior percentual de amostras positivas por bacteriologia com 60% (6/10) e 50% (5/10), respectivamente. No entanto, por PCR, *A. seminis* foi detectado com maior frequência em amostras de corpo de epidídimo e testículos esquerdos (50% cada). Notavelmente, *A. seminis* não foi detectado em nenhuma amostra de baço, fígado, linfonodos inguinais e ilíaco.

Tabela 5. Frequência (%) de detecção de *Actinobacillus seminis* por PCR e bacteriologia de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiros experimentalmente infectados após 6 semanas de infecção e carneiros não-infectados e concordância entre os métodos (%) e valores de Kappa.

Amostra	Carneiros infectados		Carneiros não infectados		Concordância (%) <sup>*</sup>	Kappa <sup>*</sup>
	Bacteriologia	PCR	Bacteriologia	PCR		
Sêmen	60,0% (42/60) <sup>a</sup>	90,0% (55/60) <sup>b</sup>	0,0% (0/27) <sup>a</sup>	0,0% (0/37) <sup>a</sup>	79,3	0,59
Sangue	0,0% (0/60) <sup>a</sup>	77,1% (53/60) <sup>b</sup>	0,0% (0/11) <sup>a</sup>	0,0% (0/11) <sup>a</sup>	25,4	0,00
Urina	51,4% (36/60) <sup>a</sup>	48,6 % (34/60) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	0,0% (0/18) <sup>a</sup>	67,7	0,35
Lavado prepucial	38,6% (27/60) <sup>a</sup>	50,0% (33/60) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	55,9	0,11

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste exato de Fisher.

<sup>\*</sup> Valores de teste Kappa considerando amostras do período experimental e controle negativo. <sup>\*\*</sup> Resultados cumulativos de amostras coletadas semanalmente durante todo o curso da (até 42 dpi).

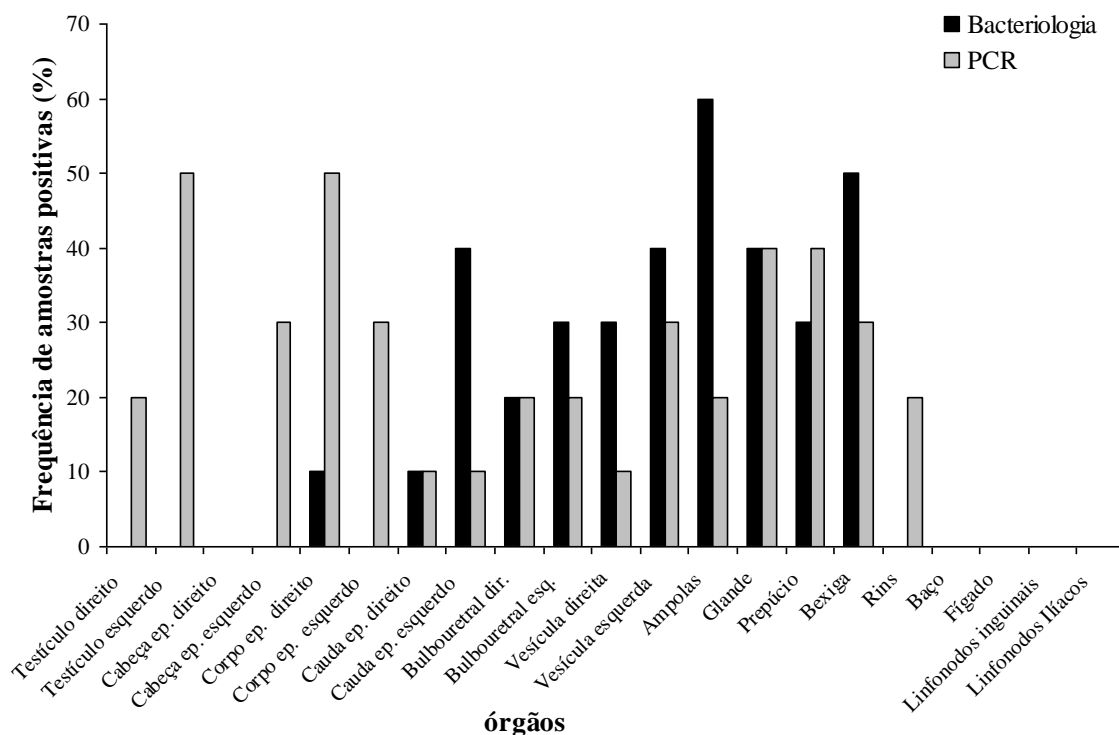


Figura 11. Frequência de amostras de órgãos positivos por bacteriologia e PCR para *Actinobacillus seminis* em ovinos experimentalmente infectados após seis semanas de infecção.

### Infecção experimental por *Histophilus somni*

A inoculação intra-epididimária por *H. somni* resultou em infecção em 80% (8/10) dos ovinos, desde que *H. somni* foi detectado por PCR simples ou bacteriologia em pelo menos um momento durante o curso da infecção (Anexo II), os quais foram todos bacteriologicamente e PCR negativos antes da infecção.

Bacteriologia e PCR resultaram em 38,3% e 58,3% de positividade ( $P < 0,05$ ), respectivamente, em amostras de sêmen (Tabela 6), com 82,9% de concordância entre as técnicas, considerado como bom. No entanto, não houve detecção de *H. somni* por bacteriologia nem PCR em nenhuma das 60 amostras de sangue coletadas, enquanto que 10% dessas amostras foram positivas

por PCR ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre bacteriologia e PCR quando realizados com amostras de urina e lavado prepucial. Além disso, todas as amostras utilizadas como controle negativo para *H. somni* foram negativas por ambas as técnicas, PCR e cultivo bacteriano (Tabela 6).

Após seis semanas de infecção, foi possível detectar *H. somni* tanto por bacteriologia quanto por PCR em diversos órgãos, particularmente no trato reprodutivo (Figura 12). *H. somni* foi isolado por cultivo bacteriano com maior frequência das vesículas seminais esquerdas (50%, 5/10) e bexiga (40%, 4/10). Já por PCR, os tecidos com maior percentual de amostras positivas foram caudas dos epidídimos esquerdas (60%, 5/10) e testículos esquerdos (50%, 5/10). Considerando todos os tecidos, a

bacteriologia foi positiva em 28,1% (59/210)  
e a PCR em 29,5% (62/210) das amostras,

sem diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os  
métodos.

Tabela 6. Frequência (%) de detecção de *Histophilus somni* por PCR e bacteriologia de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiros experimentalmente infectados após seis semanas de infecção e carneiros não infectados, e concordância entre os métodos (%) e valores de Kappa.

Amostra	Carneiros infectados		Carneiros não infectados		Concordância (%) <sup>*</sup>	Kappa <sup>*</sup>
	Bacteriologia	PCR	Bacteriologia	PCR		
Sêmen	38,3% (23/60) <sup>a</sup>	58,3% (35/60) <sup>b</sup>	0,0% (0/27) <sup>a</sup>	0,0% (0/37) <sup>a</sup>	86,2	0,70
Sangue	0,0% (0/60) <sup>a</sup>	10,0% (6/60) <sup>a</sup>	0,0% (0/11) <sup>a</sup>	0,0% (0/11) <sup>a</sup>	91,4	0,00
Urina	40,0% (24/60) <sup>a</sup>	23,3% (14/60) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	0,0% (0/18) <sup>a</sup>	73,5	0,36
Lavado Prepucial	35,0% (21/60) <sup>a</sup>	30,0% (18/60) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	0,0% (0/8) <sup>a</sup>	72,1	0,32

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste exato de Fisher.

<sup>\*</sup> Valores de teste Kappa considerando amostras do período experimental e controle negativo. <sup>\*\*</sup> Resultados cumulativos de amostras coletadas semanalmente durante todo o curso da (até 42 dpi).



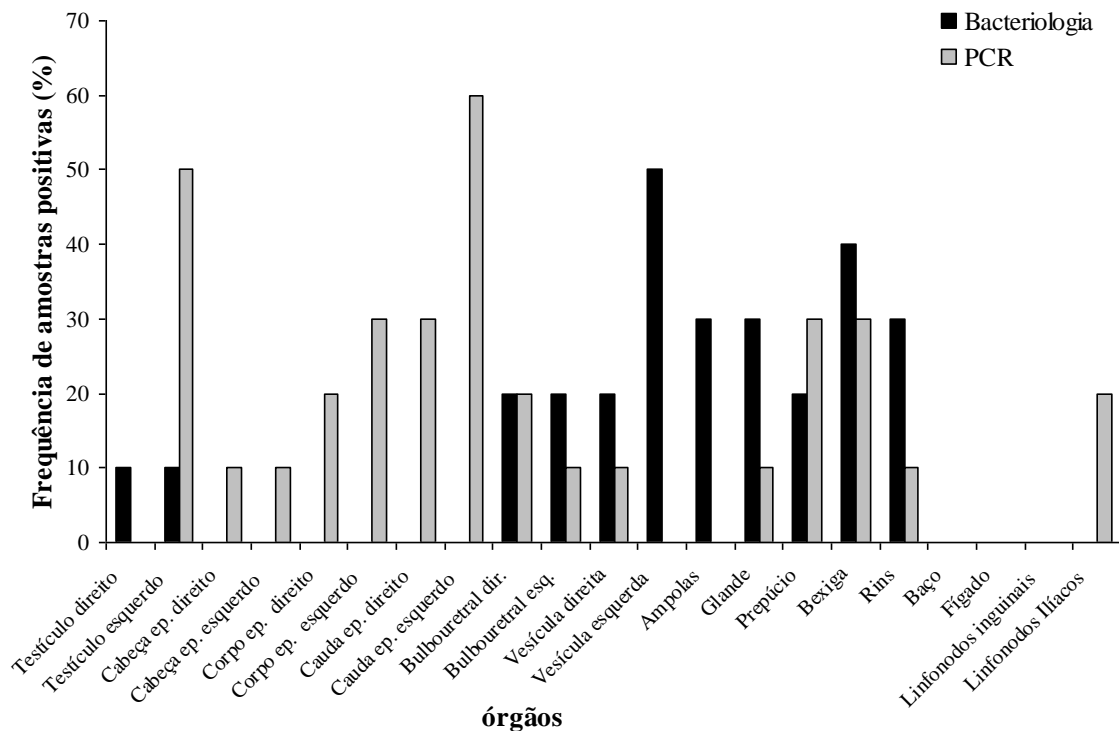


Figura 12. Frequência de amostras de órgãos positivos por bacteriologia e PCR para *Histophilus somni* em ovinos experimentalmente infectados após seis semanas de infecção.

### Sensibilidade e especificidade da PCR multiplex

A sensibilidade analítica da PCR multiplex foi avaliada utilizando apenas DNA genômico bacteriano dos três agentes, em diferentes concentrações. Dentre as 64 combinações de DNA testadas, algumas resultaram em diminuição da sensibilidade do teste (Anexo III). Mesmo em concentrações equimolares, utilizando apenas 0,2 ng DNA de cada agente por reação, a amplificação do DNA de *H. somni* foi inibida (Figura 13). A inibição da reação

multiplex também ocorreu quando a concentração de DNA de um dos agentes foi 100 vezes maior que a dos outros dois microrganismos. Portanto, quando a concentração de DNA genômico de *A. seminis* e *B. ovis* ou *H. somni* e *B. ovis* foram de 200 ng por reação, e a do terceiro agente de 2 ng por reação, houve inibição da amplificação do DNA do terceiro agente. No entanto, mesmo quando as concentrações de DNA de *A. seminis* e *H. somni* foram 100 vezes maiores, a amplificação de DNA de *B. ovis* não foi inibida.

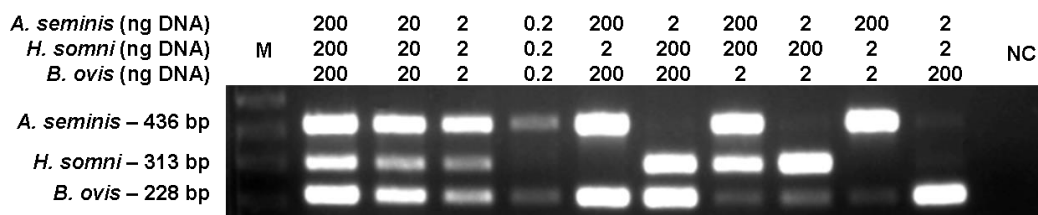


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR multiplex para detecção de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* com DNA genômico extraído de culturas puras. M: marcador de peso molecular; NC: controle negativo sem DNA genômico.

Os resultados da PCR multiplex em amostras de sêmen artificialmente contaminadas, com diluição seriada de cada um dos três agentes isoladamente, estão apresentados na Tabela 7. Comparada à PCR simples, a PCR multiplex apresentou o mesmo limite de detecção para *B. ovis* ( $10^4$  UFC/mL). No entanto, o limite de detecção para *A. seminis* diminuiu 10 vezes ( $10^1$  para

$10^2$  UFC/mL). A PCR multiplex não detectou o DNA de *H. somni* em amostras de sêmen artificialmente contaminadas. Em contraste, o mesmo método de PCR multiplex detectou o DNA de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* simultaneamente em três amostras distintas de misturas de sêmen provenientes de carneiros experimentalmente infectados (Tabela 8).

Tabela 7. Sensibilidade analítica da PCR simples e multiplex em sêmen contaminado com  $10^0$  a  $10^6$  UFC/mL de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* ou *Histophilus somni*.

		UFC/mL de sêmen						
		$10^0$	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
<b>PCR simples</b>	<i>B. ovis</i>	-	-	-	-	+	+	+
	<i>A. seminis</i>	-	+	+	+	+	+	+
	<i>H. somni</i>	-	-	-	+	+	+	+
<b>PCR multiplex</b>	<i>B. ovis</i>	-	-	-	-	+	+	+
	<i>A. seminis</i>	-	-	+	+	+	+	+
	<i>H. somni</i>	-	-	-	-	-	-	-

+ : positivo; -: negativo

Tabela 8. Detecção simultânea do DNA de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* por PCR multiplex em combinações de amostras de sêmen\* provenientes de carneiros experimentalmente infectados.

Amostras de sêmen	PCR multiplex		
	<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>
Mistura 1	+	+	+
Mistura 2	+	+	+
Mistura 3	+	+	+
Controle negativo	-	-	-

\*Amostras de sêmen positivas por PCR simples para cada agente.

+ : positivo; -: negativo

A PCR multiplex espécie-específica foi igualmente eficaz ( $P > 0,05$ ; pelo teste exato de Fisher) quando comparada à PCR simples para a detecção do DNA dos três agentes em amostras de sêmen provenientes de carneiros experimentalmente infectados. A PCR multiplex resultou em amplificação em 87% (13/15) das amostras positivas para *B. ovis*, 87% (13/15) das positivas para *A. seminis* e 73% (11/15) das amostras positivas para *H. somni*. Adicionalmente, todas as 27 amostras utilizadas como controle negativo foram negativas na PCR multiplex.

No presente estudo foi demonstrado que a PCR multiplex com iniciadores espécie-específicos não amplifica DNA de outras espécies de bactérias que podem potencialmente causar epididimite como *S. aureus*, *M. haemolytica*, *C. pseudotuberculosis* e *A. pyogenes*, nem o DNA de espécie filogeneticamente relacionada à *B. ovis*, como *O. anthropi* (Tabela 9).

Tabela 9. Especificidade da PCR simples e multiplex com diferentes espécies bacterianas relacionadas à epididimite ovina ou filogeneticamente similares a *Brucella ovis*.

Espécie bacteriana	PCR simples			PCR multiplex
	<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	
<i>Brucella ovis</i> (ATCC 25840)	+	-	-	+
<i>Actinobacillus seminis</i> (ATCC15768)	-	+	-	+
<i>Histophilus somni</i> (3384Y)	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600)	-	-	-	-
<i>Manheimia haemolytica</i> (D0614057)	-	-	-	-
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (D0507204)	-	-	-	-
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (D0602705)	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum antropi</i> (ATCC 49188)	-	-	-	-

+ : positivo; -: negativo

## DISCUSSÃO

A PCR multiplex desenvolvida no presente estudo foi baseada em ensaios prévios espécie-específicos para *B. ovis* (Xavier et al., 2010), *A. seminis* (Appuhamy et al., 1998) e *H. somni* (Saunders et al., 2007). Apesar de Saunders et al. (2007) terem desenvolvido a PCR multiplex para detecção de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, o presente ensaio de PCR multiplex é a primeira técnica espécie-específica.

O método desenvolvido neste estudo foi comprovado como uma ferramenta de diagnóstico eficiente em casos de epididimite ovina, que é uma enfermidade infecto-contagiosa que pode afetar carneiros jovens e maduros, e na maioria dos casos está associada com infecções por *B. ovis*, *A. seminis* ou *H. somni*. Geralmente, o diagnóstico definitivo dessas infecções é baseado no isolamento bacteriano, o qual pode ser difícil devido à ausência de meio seletivo e à variedade morfológica e bioquímica das culturas de *A. seminis* e *H. somni* (Ward et al., 1995; Appuhamy et al., 1998). Cabe ressaltar que testes sorológicos estão disponíveis para o diagnóstico apenas da infecção por *B. ovis* (Xavier et al., 2011), embora a sorologia possua limitações amplamente documentadas nesses casos (Xavier et al., 2011; Costa et al., 2012). Além disso, o crescimento de bactérias contaminantes no sêmen, urina e lavado prepucial podem sobrepor o crescimento dos patógenos, que possuem crescimento mais fastidioso. Dessa forma, ensaios de PCR são considerados como alternativas para superar as limitações da bacteriologia (Bricker, 2002), especialmente se a técnica de PCR é direta e identifica a espécie do agente.

Notavelmente, no caso de *B. ovis*, o método de PCR multiplex desenvolvido no presente estudo é baseado na amplificação de sequências localizadas na ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (Silva et al., 2011), que está ausente em outras espécies

de *Brucella* que infectam os animais domésticos (Tsolis et al., 2009). Assim, o método desenvolvido neste trabalho permite a diferenciação entre as infecções por *B. ovis* e *B. melitensis*, pois esses microrganismos são igualmente capazes de infectar pequenos ruminantes. No entanto, enquanto *B. ovis* é considerada não patogênica a humanos, *B. melitensis* é a espécie de maior potencial zoonótico entre todas as espécies de *Brucella* (Xavier et al., 2009). Além disso, rebanhos identificados como positivos para *B. ovis* utilizando o método de PCR multiplex espécie-específico desenvolvido neste estudo podem ser posteriormente investigados, utilizando uma técnica mais sensível recentemente desenvolvida de PCR *nested* espécie-específico (Costa et al., 2013).

Em ambas as infecções experimentais realizadas neste estudo, a PCR simples e a bacteriologia combinadas foram utilizadas para assegurar que os carneiros foram realmente infectados após a inoculação. Amostras biológicas coletadas durante as duas infecções também foram utilizadas para validar o ensaio de PCR multiplex desenvolvido neste estudo. Mesmo sem qualquer sinal clínico de epididimite ou orquite, oito (8/10) carneiros foram positivos por PCR de sêmen para *A. seminis* no momento pré-inoculação, mas nenhuma das amostras foi positiva por bacteriologia. É sabido que *A. seminis* é habitante natural da mucosa prepucial de ovinos jovens e sua presença não está necessariamente relacionada à doença, que pode se desenvolver quando o microrganismo age como um patógeno oportunista (Walker e Leamaster, 1986). Dessa forma, para o correto diagnóstico de epididimite induzida por *A. seminis*, independentemente do método laboratorial empregado, este deve sempre ser associado com exame clínico minucioso (Burgess, 1982; Santos et al., 2005).

Geralmente, a técnica de PCR tende a ser mais sensível que a bacteriologia (Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010), o que ficou evidenciado neste estudo, particularmente com amostras de sêmen e sangue. Em ambas as infecções experimentais realizadas, a bacteriologia detectou a agente causador. Embora a cultura de sangue seja considerada como padrão ouro para diagnóstico de diferentes infecções bacterianas, a mesma pode ser lenta e insuficientemente sensível em casos de microrganismos de crescimento fastidioso ou quando a carga bacteriana é baixa (Wing et al., 2000; Waterer e Wunderink, 2001; Peters et al., 2004). Para a detecção por PCR, apenas o DNA alvo e não organismos viáveis são requeridos para sucesso no diagnóstico. Isso explica, em partes, as diferenças de sensibilidade entre as duas técnicas utilizadas no presente estudo, que refletiram em baixa concordância entre os métodos com algumas das amostras biológicas testadas.

Sêmen tem sido utilizado como amostra biológica de escolha para fins de diagnóstico de epididimite ovina (Burgess, 1982; Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007; Xavier et al., 2010). Como recentemente descrito para a infecção por *B. ovis* (Xavier et al., 2010), o presente estudo confirmou que a urina pode ser considerada como amostra alternativa para o diagnóstico direto das infecções por *A. seminis* e *H. somni*. Amostras de sangue não foram satisfatórias para detectar a infecção por *H. somni* e assim esta não deve ser utilizada para o diagnóstico de epididimite infecciosa ovina.

O teste de sensibilidade analítica indicou que a PCR multiplex espécie-específica foi capaz de detectar o DNA de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* simultaneamente, sob diferentes condições, confirmando que o ensaio pode ser também efetivo para o diagnóstico de infecções mistas. Adicionalmente, o ensaio de PCR multiplex foi demonstrado como específico para as espécies alvo e não exibindo reações

cruzadas com outros microrganismos que também podem causar epididimite infecciosa em ovinos.

## CONCLUSÃO

A PCR multiplex espécie-específica desenvolvido neste estudo pode ser usada com sucesso no diagnóstico das infecções por *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* em ovinos. Além disso, essa técnica pode ser uma alternativa prática ao isolamento bacteriano. Urina pode ser usada como amostra alternativa ao sêmen para extração de DNA e emprego da PCR multiplex descrita neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J.; et al. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum. Reprod.*, v.10, p.2061-2071, 1995.
- AL-KATIB, W.A.; DENNIS, S.M. Early sequential findings in the genitalia of rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis*. *N. Z. Vet. J.*, v.56, p.50-54, 2008.
- AL-KATIB, W.A.; DENNIS, S.M. Epididymal and testicular lesions in rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *N. Z. Vet. J.*, v.55, p.125-129, 2007.
- AL-KATIB, W.A.; DENNIS, S.M. Experimental transmission of *Actinobacillus seminis* infection to rams. *Vet. Rec.*, v.157, p.143-147, 2005.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris: INRA, 1988. 190p.

- ANGEN, O.; AHRENS, P.; KUHNERT, P.; et al. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species incertae sedis '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.53, p.1449-1456, 2003.
- APPUHAMY, S.; LOW, J.C.; PARTON, R.; et al. Specific PCR iniciadores from the 16S-23S rRNA spacer region for the rapid detection and identification of *Actinobacillus seminis*. *J. Appl. Microbiol.*, v.85, p.941-948, 1998.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Agrop. Tec.*, v.25, p.45-50, 2004.
- BAGLEY, C.V.; BURRELL, W.C.; ESPLIN, G.M.; et al. Effect of epididymitis on semen quality of rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.185, p.876-877, 1984.
- BAGLEY, C.V.; PASKETT, M.E.; MATTHEWS, N.J.; et al. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.186, p.798-801, 1985.
- BAYNES, I.D.; SIMMONS, G.C. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Aust. Vet. J.*, v.36, p.454-459, 1960.
- BEAUREGARD M, HIGGINS R. Ovine mastitis due to *Histophilus ovis*. *Can. Vet. J.*, v.24, p.284-286, 1983.
- BEZERRA, M.J.G.; SANTOS, A.S.; CRUZ, J.A.L.O.; et al. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco, *Pesq. Vet. Bras.*, v.32, p.369-373, 2012.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H.; et al. Epididymitis in ram: Studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, n.1, p.27-41, 1964.
- BLASCO, J.M. La epididimitis contagiosa del morueco (infeccion por *Brucella ovis*) Revision bibliografica. *Comunicaciones I.N.I.A.*, n.5, 47 p., 1983.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 102 (Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina), publicada no Diário Oficial da União de 17/12/2004, Seção 1, p. 24. PORTARIA Nº 102, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004 17/12/2004.
- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.435-436, 2002.
- BROWN, G.M.; RANGER, C.R.; KELLEY, D.J. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Vet.*, v.61, p.265-280, 1971.
- BUCKRELL, B.C.; MCEWEN, S.A.; JOHNSON, W.H.; et al. Epididymitis caused by *Brucella ovis* in a Southern Ontario sheep flock. *Can. Vet. J.*, v.26, p.293-296, 1985.
- BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.
- CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, p.983-987, 1987.
- CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic

- findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.*, v.102, p.213-222, 2012.
- CARVALHO JÚNIOR, C.A.; XAVIER, M.N.; COSTA, L.F.; et al. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, p.160-167, 2010.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2nd ed. Colégio Brasileiro de reprodução animal (CBRA), Belo Horizonte, 1998.
- CERRI, D.; AMBROGI, C.; EBANI V.V.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in Mouflon (*Ovis musimon*). *J. Wild Dis.*, v.38, p.287-290, 2002.
- CLAPP, K.H. A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. *Aust. Vet. J.*, v.31, p.27-28, 1955.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, v.54, p. 262-263, 1978.
- CLAXTON, P.D.; EVERETT, R.E. Recovery of an organism resembling *Histophilus ovis* from a ram. *Aust. Vet. J.*, v.42, p.457-458, 1966.
- CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; et al. Inquérito soropidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semiárido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.137-143, 2007.
- CORBEIL, L.B.; WIDDERS, P.R.; GOGOLEWSKI, R.P.; et al. *Haemophilus somnus*: bovine reproductive and respiratory disease. *Can. Vet. J.*, v.27, p.90-93, 1986.
- COSTA, E.A.; SANT'ANA, F.M.; CARVALHO, C.J.S.; et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the state of Piauí. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p.751-754, 2012.
- COSTA, L.F.; NOZAKI, C.N.; LIRA, N.S.C.; et al. Species-specific nested PCR as diagnostic tool for *Brucella ovis* infection in rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.1, p.55-60, 2013.
- DÍAZ-APARICIO, E.; TENORIO-GUTIÉRREZ, V.R.; ARELLANO-REYNOSO, B.; et al. Pathogenicity of different strains of *Histophilus somni* in the experimental induction of ovine epididymitis. *Can. J. Vet. Res.*, v.73, p.157-160, 2009.
- FOSTER, G.; COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; et al. *Actinobacillus seminis* as a cause of abortion in a UK sheep flock. *Vet. Rec.*, v.144, p.479-480, 1999.
- GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M.; et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, p.267-276, 2010.
- GOMES, M.J.P.; DRIEMEIER, D.; BONETTI, A.L.; et al. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis* no RS, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.29, p.55-58, 2001.
- GONÇALVES, V.S.P.; AKIMOTO, B.M.; DILLI, T.B.; et al. Soroprevalência e fatores de risco da epididimite ovina em rebanhos comerciais do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 6, 2005, Búzios-RJ.
- GREGORY, L.; RIZZO, H.H.; MEIRA JUNIOR, E.B.S.; et al. Relato do



- primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.33, p.105-107, 2009.
- GUMBRELL, R.C.; SMITH, J.M.B. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine actinobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, v.84, p.399-402, 1974.
- HAJTÓS, I.; FODOR, L.; GLÁVITS, R.; et al. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. *J. Vet. Med.*, v.34, p.138-147, 1987.
- HEATH, P.J.; DAVIES, I.H.; MORGAN, J.H.; et al. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, v.129, p.304-307, 1991.
- HELLENBRAND, K.M.; FORSYTHE, K.M.; RIVERA-RIVAS, J.J.; et al. *Histophilus somni* causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages. *Microb. Pathog.*, p.1-9, 2012.
- HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; STALF, T.; et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil. Steril.*, v.83, p.635-642, 2005.
- HUGHES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection. 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.*, v.44, p.41-47, 1968.
- HUMPHREY, J.D.; LITTLE, P.B.; STEPHENS, L.R.; et al. Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, p.791-795, 1982.
- HUMPHREY, J.D.; STEPHENS, L.R. “*Haemophilus somnus*”: a review. *Vet. Bull.*, v.53, p.987-1004, 1983.
- IBGE 2008. Produção da pecuária municipal, Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 35:1-62. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2007/ppm2007.pdf>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2013.
- JANSEN, B.C. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. *J. Vet. Res.*, v.50, p.275-282, 1983.
- KENNEDY, F.C.; FRAZIER, L.M.; THEILEN, G.H.; et al. A septicemic disease of lambs caused by *Hemophilus agni* (new species). *Am. J. Vet. Res.*, v.19, p.645-654, 1958.
- KROGH, H.V.; PEDERSEN, K.B.; BLOM, E. *Haemophilus somnus* in semen from Danish bulls. *Vet. Rec.*, v.112, p.460, 1983.
- KWIECIEN, J.M.; LITTLE, P.B. Isolation of pathogenic strains of *Haemophilus somnus* from the female bovine reproductive tract. *Can. J. Vet. Res.*, v.56, p.127-134, 1992.
- LAWS, L.; SIMMONS, G.C.; LUDFORD, C.G. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.313-317, 1972.
- LEES, V.W.; YATES, W.D.; CORBEIL, L.B. Ovine *Haemophilus somnus*: Experimental intracasternal infection and antigenic comparison with bovine *Haemophilus somnus*. *Can. J. Vet. Res.*, v.58, p.202-210, 1994.
- LIVINGSTON, C.W.; HARDY, W.T. Isolation of *Actinobacillus seminis* from

- ovine epididymitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.25, p.660-663, 1964.
- LOW, J.C.; GRANHAM, M.M. *Histophilus ovis* epididymitis in a ram in the UK. *Vet. Rec.*, v.117, p.64-65, 1985.
- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.75-79, 1996.
- MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.65-72, 2003.
- MARÍN, C.M.; JIMENES DE BAGUES, M.P.; BLASCO, J.M.; et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.*, v.125, p.504-508, 1989.
- MARQUES, A.P.R. Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e *Brucella ovis* em ovinos no estado de Minas Gerais. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MATRONE, M.; KEID, L.B.; ROCHA, V.C.M.; et al. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, p.480-489, 2009.
- McFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G.; et al. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust. Vet. J.*, v.28, p.221-226, 1952.
- MIEUSSET, R.; CASARES, P.Q.; PARTIDA, L.G.S.; et al. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, v.94, p.337-343, 1992.
- MEYER, M.E.; CAMERON, H.S. Studies on the etiological agent of epididymitis in rams. *Am. J. Vet. Res.*, v.17, p.495-497, 1956.
- MYERS, D.M.; SINIUK, A. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Appl. Microbiol.*, v.19, p.335-337, 1970.
- NILO, L.; MACDONALD, D.W.; GODKING, G.F.; et al. Ovine Brucellosis in Alberta. *Can. Vet. J.*, v.27, p.245-249, 1986.
- NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C.; et al. Comparação das técnicas de Imunodifusão em Gel de Agar e Elisa no diagnóstico de brucelose ovina em Cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, p.1-5, 2004.
- PETERS, R.P.; VAN AGTMAEL, M.A.; DANNER, S.A.; et al. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet. Infect. Dis.*, v.4, p.751-760, 2004.
- PHILBEY, A.W.; GLASTONBURY, J.R.; ROTHWELL, J.T.; et al. Meningoencephalitis and other conditions associated with *Histophilus ovis* infection in sheep. *Aust. Vet. J.*, v.68, p.387-390, 1991.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura

- cearense. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.534-543, 2000.
- PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; et al. Ocorrência de ovinos sororeatores para *Brucella ovis* no estado de Alagoas, Brasil. *Vet. Zootec.*, v.16, p.500-508, 2009.
- PUNTE-REDONDO, V.A.; GARCIA DEL BLANCO, N.; PÉREZ-MARTÍNEZ, C.; et al. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital Tract of Rams in Spain. *J. Comp. Path.*, v.122, p.217-222, 2000.
- RAHALEY, R.S.; WHITE, W.E. *Histophilus ovis* infection in sheep in Western Victoria. *Aust. Vet. J.*, v.53, p.124-127, 1977.
- RAMOS, A.A.; MIES FILHO, A.; SHENCK, J.A.P.; et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.1, p.211-213, 1966.
- RIZZO, H.; GREGORY, L.; CARVALHO, A.F.; et al. Primeiro relato de isolamento de *Histophilus somni* em ovino com quadro de endometrite no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.36, p.136-138, 2012.
- RIZZO, H.; GREGORY, L.; PINHEIRO, E.S.; et al. Incidência de *Brucella ovis* em ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos no estado de São Paulo, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, SUPLEMENTO 1 - VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA – ANAIS p.591-596, 2009.
- ROBERTS D. A new pathogen from a ewe with mastitis. *Aust. Vet. J.*, v.32, p.330-332, 1956.
- ROBLES, C.A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Rev. Med. Vet.*, v.79, p.67-71, 1998.
- ROBLES, C.A. Brucelosis em carneros por *Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27 p.
- ROBLES, C.A.; URCULLU, J.A.; UZAL, F.A.; et al. Primer diagnostico em Patagonia de orchideoepididimitis em carneros por bacilos pleomorficos Gram negativos. *Vet. Argent.*, v.7, p.453-455, 1990.
- SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella Ovis*. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, v.47, p.42-56, 2005.
- SAUNDERS, V.F.; REDDACLIFF, L.A.; BERG, T.; et al. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.*, v.85, p. 72-77, 2007.
- SCANLAN, C.M.; HEALEY, M.C.; TORRES, A.R.; et al. Cultural and biochemical characterization of *Actinobacillus* and *Actinobacillus-like* species from ram lambs with epididymitis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, p.288-294, 1989.
- SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V.; et al. Abortamento e morte embrionária em receptoras bovinas por *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*). *Acta Sci. Vet.*, v.32, p.59-64, 2004.
- SCHREINER, E.; GOMES, M.J.P.; CARDOSO, M.I.; et al. Epididimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul. In: XI CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINARIA, Gramado, p.96,1992.

- SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S; et al. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciên. Anim.*, v.13, p.51-54, 2003.
- SILVA, N.S.; BARROS, I.N.; DASSO, M.G.; et al. Detecção de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos do estado da Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, p.852-859, 2009.
- SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; et al. Putative ATP-Binding Cassette Transporter is Essential for *Brucella ovis* pathogenesis in Mice. *Infec. Immun.*, v.79, p.1706-1717, 2011.
- SIMPLÍCIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O.; et al. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos de corte em regiões tropicais. Documentos 35, Embrapa Caprinos, Sobral. 47p. 2001.
- SPONENBERG, D.P.; CARTER, M.E.; CARTER, G.R.; et al. Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.182, p.990-991, 1983.
- TONDER, E.M.V. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.44, p.235-240, 1973.
- TSOLIS, R.M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *Plos One*, 4:e5519, 2009.
- WALKER, L.R.; LEAMASTER, R.B. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.1928-1930, 1986.
- WALKER, R.L.; LEAMASTER, B.R.; STELLFUG, J.N.; et al. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.188, p.393-396, 1986.
- WARD, A.C.S.; JAWORSKI, M.D.; EDDOW, J.M.; et al. A comparative study of bovine and ovine *Haemophilus somnus* isolates. *Can. J. Vet. Res.*, v.59, p.173-178, 1995.
- WATERER, G.W.; WUNDERINK, R.G. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. *Respir. Med.*, v.95, p.78-82, 2001.
- WEBB, R.F.; QUINN, C.A.; COCKRAM, F.A.; et al. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.56, p.172-175, 1980.
- WEST, D.M.; BRUCE, R.A. Observations on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. *N. Z. Vet. J.*, v.39, p.29-31, 1991.
- WING, D.A.; PARK, A.S.; DEBUQUE, L.; et al. Limited clinical utility of blood and urine cultures in the treatment of acute pyelonephritis during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.182, p.1437-1440, 2000.
- WORTHINGTON, R.W.; BOSMAN, P.P. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *J. South Afr. Vet. Med. Assoc.*, v.39, p.81-85, 1968.
- WORTHINGTON, R.W.; STEVENSON, B.J.; DE LISLE, G.W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N. Z. Vet. J.*, v.33, p.84-86, 1985.
- WORTHINGTON, R.W.; WEDDEL, W.; PENROSE, M.E. A comparison of three

- serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *N. Z. Vet. J.*, v.31, p.58-60, 1984.
- XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural*, v.39, p.2252-2260, 2009.
- XAVIER, M.N.; SANT'ANNA, F.M.; SILVA, T.M.A.; et al A comparison of two agar gel immunodiffusion (AGID) and a complement fixation (CF) assays for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1016-1021, 2011.
- XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.

**ANEXO I** - Resultados da infecção experimental por *Actinobacillus seminis*, por carneiro, ao longo das seis semanas de infecção.

Carneiro 1

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	+	+	+	+	-
21	+	+	-	-	+	+	+	-
28	+	+	-	+	+	-	-	-
35	+	+	-	+	+	-	+	-
42	-	+	-	+	-	+	-	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

Carneiro 2

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	+	-	+
14	+	+	-	+	+	+	-	+
21	+	+	-	+	-	+	-	-
28	+	+	-	+	-	-	-	+
35	+	+	-	-	+	+	+	+
42	+	+	-	+	-	+	-	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

Carneiro 3

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	-	+	-	-
14	+	+	-	+	+	+	+	+
21	+	+	-	+	-	-	-	-
28	+	+	-	+	-	-	+	+
35	+	+	-	+	+	+	+	+
42	+	+	-	+	-	+	-	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 4

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	+	+	+
14	+	+	-	+	+	-	-	-
21	+	+	-	+	+	+	-	+
28	+	+	-	+	+	+	-	+
35	+	+	-	+	+	+	-	+
42	+	-	-	+	+	+	+	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 5

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	+	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	+	-	+	-	+
21	-	+	-	+	-	+	+	+
28	+	+	-	+	+	+	+	+
35	-	+	-	+	+	-	+	+
42	-	+	-	-	+	+	+	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 6

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	-	+	-	+	-
14	+	+	-	+	+	-	+	-
21	+	+	-	+	+	+	+	+
28	+	+	-	+	+	-	+	+
35	+	+	-	+	+	+	-	+
42	+	+	-	+	+	+	-	+

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 7

D.p.i.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	-	-	+	+	-	+	+
14	+	+	-	-	+	-	+	-
21	+	+	-	+	+	+	+	+
28	+	+	-	+	+	+	+	-
35	+	+	-	+	+	+	+	+
42	+	+	-	+	-	-	+	+

+: positivo; -: negativo; DPL.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 8

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	-	-	+	-	-	-	-
14	-	+	-	+	+	-	-	+
21	-	+	-	+	-	-	-	-
28	-	+	-	+	-	-	-	-
35	-	+	-	+	-	-	-	-
42	-	+	-	-	-	-	-	+

+: positivo; -: negativo; DPL.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 9

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	-	+	-
14	+	+	-	+	+	-	+	-
21	+	+	-	+	-	+	-	+
28	+	+	-	+	+	+	-	+
35	+	+	-	+	+	+	-	+
42	+	+	-	+	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo; DPL.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.



Carneiro 10

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	-	-	+	-	+	-	-
14	-	+	-	+	-	-	-	-
21	-	+	-	+	-	-	-	-
28	-	+	-	+	-	-	-	-
35	-	+	-	+	+	+	-	+
42	-	+	-	+	-	+	-	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

**ANEXO II** - Resultados da infecção experimental por *Histophilus somni*, por carneiro, ao longo das seis semanas de infecção.

Carneiro 11

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	-	-	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

Carneiro 12

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	-	-	-	-	+
21	-	+	-	-	-	-	-	-
28	+	+	-	-	+	-	+	+
35	-	-	-	-	+	-	-	-
42	+	+	-	-	+	-	-	-

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

Carneiro 13

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	+	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	+	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 14

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	-	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	+
35	-	+	-	-	-	-	-	+
42	-	+	-	-	-	-	-	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 15

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	-	+	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 16

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	-	+	+	-	+
14	+	+	-	-	-	+	+	+
21	+	+	-	-	+	-	+	-
28	+	+	-	-	+	-	+	+
35	+	-	-	-	+	+	-	+
42	+	+	-	-	+	+	-	+

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 17

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	-	+	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	+	-	+	-
28	+	+	-	-	+	+	+	+
35	+	+	-	-	+	-	+	+
42	-	+	-	-	-	+	-	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 18

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	+	-	+
14	-	+	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	+	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

## Carneiro 19

D.P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado	
	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR
7	+	+	-	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	-	+	+	+
21	+	+	-	-	+	-	+	-
28	+	+	-	-	+	-	+	-
35	+	+	-	-	+	-	+	-
42	-	-	-	-	+	+	+	-

+: positivo; -: negativo; D.P.I.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

Carneiro 20

<b>D.P.I.</b>	<b>Sêmen</b>		<b>Sangue</b>		<b>Urina</b>		<b>Lavado</b>	
	<b>BACT</b>	<b>PCR</b>	<b>BACT</b>	<b>PCR</b>	<b>BACT</b>	<b>PCR</b>	<b>BACT</b>	<b>PCR</b>
<b>7</b>	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>14</b>	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>21</b>	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>28</b>	+	+	-	-	+	-	+	-
<b>35</b>	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>42</b>	-	+	-	-	+	-	+	-

+: positivo; -: negativo; DPI.: dias pós-infecção; BACT: bacteriologia.

**ANEXO III** - Resultados de sensibilidade analítica da PCR convencional multiplex, utilizando-se DNA genômico de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*, em diferentes concentrações e combinações.

DNA/reação			Resultado PCR multiplex		
<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>
200ng	200ng	200ng	+	+	+
200ng	200ng	20ng	+	+	+
200ng	200ng	2ng	+	+	-
200ng	200ng	0,2ng	+	+	-
200ng	20ng	200ng	+	+	+
200ng	2ng	200ng	+	-	+
200ng	0,2ng	200ng	+	-	+
20ng	200ng	200ng	+	+	+
2ng	200ng	200ng	-	+	+
0,2ng	200ng	200ng	-	+	+
20ng	20ng	200ng	+	+	+
20ng	20ng	20ng	+	+	+
20ng	20ng	2ng	+	+	+
20ng	20ng	0,2ng	+	+	-
20ng	200ng	20ng	+	+	+
20ng	2ng	20ng	+	+	+
20ng	0,2ng	20ng	+	-	+
200ng	20ng	20ng	+	+	+
2ng	20ng	20ng	+	+	+
0,2ng	20ng	20ng	-	+	+
2ng	2ng	200ng	+	-	+
2ng	2ng	20ng	+	+	+
2ng	2ng	2ng	+	+	+
2ng	2ng	0,2ng	+	+	+
2ng	200ng	2ng	+	+	-
2ng	20ng	2ng	+	+	+
2ng	0,2ng	2ng	+	-	+
200ng	2ng	2ng	+	+	+
20ng	2ng	2ng	+	+	+
0,2ng	2ng	2ng	-	+	+
0,2ng	0,2ng	200ng	-	-	+
0,2ng	0,2ng	20ng	-	-	+
0,2ng	0,2ng	2ng	-	-	+
0,2ng	0,2ng	0,2ng	+	+	+
0,2ng	200ng	0,2ng	-	+	-

DNA/reacção			Resultado PCR multiplex		
<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>	<i>A seminis</i>	<i>H. somni</i>
0,2ng	20ng	0,2ng	-	+	-
0,2ng	2ng	0,2ng	+	+	+
200ng	0,2ng	0,2ng	+	-	-
20ng	0,2ng	0,2ng	+	-	-
2ng	0,2ng	0,2ng	+	+	+
2ng	20ng	200ng	+	+	+
0,2ng	20ng	200ng	-	+	+
20ng	2ng	200ng	+	-	+
0,2ng	2ng	200ng	-	-	+
20ng	0,2ng	200ng	+	-	+
2ng	0,2ng	200ng	+	-	+
2ng	200ng	20ng	+	+	+
0,2ng	200ng	20ng	-	+	+
20ng	200ng	2ng	+	+	-
0,2ng	200ng	2ng	-	+	-
20ng	200ng	0,2ng	+	+	-
2ng	200ng	0,2ng	+	+	-
200ng	20ng	2ng	+	+	-
200ng	20ng	0,2ng	+	+	-
200ng	2ng	20ng	+	+	+
200ng	2ng	0,2ng	+	+	-
200ng	0,2ng	20ng	+	-	+
200ng	0,2ng	2ng	+	-	+
0,2ng	2ng	20ng	-	+	+
2ng	0,2ng	20ng	+	-	+
0,2ng	20ng	2ng	-	+	+
20ng	0,2ng	2ng	+	-	+
0,2ng	0,2ng	2ng	-	-	+
2ng	20ng	0,2ng	+	+	-
20ng	2ng	0,2ng	+	+	-