

**SILVIA DE ARAÚJO FRANÇA**

**ELISA INDIRETO COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA  
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Brucella ovis* EM CARNEIROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Patologia Animal

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

**Co-orientadores:** Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão  
Dra. Érica Azevedo Costa  
Dra. Juliana Pinto da Silva Mol

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2013.

F814e França, Silvia de Araújo, 1974-  
Elisa indireto com proteínas recombinantes para diagnóstico da infecção por *Brucella ovis*  
em carneiros / Silvia de Araújo França. – 2013.  
60 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

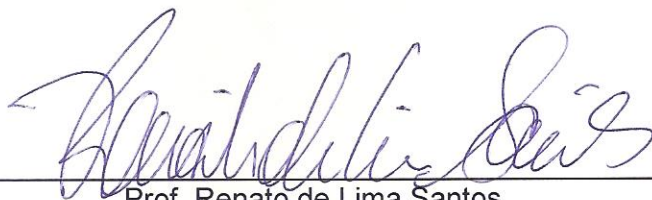
Co-orientadores: Tatiane Alves da Paixão, Érica Azevedo Costa, Juliana Pinto da Silva Mol  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Carneiro – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Teste imunoenzimático – Teses.
3. Brucelose em animais – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane Alves da.
- III. Costa, Érica Azevedo. IV. Mol, Juliana Pinto da Silva. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.308 96


Tese defendida e aprovada em 07 de março de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente



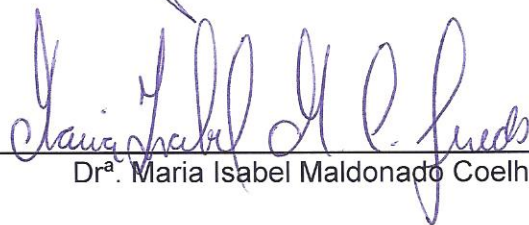
Profª. Jane Megid



Dr. Marcelo Fernandes Camargos



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Drª. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes



**“Eu, O Senhor, O Senhor teu Deus, te tomo pela tua mão direita e te ajudo...”**

**Dedico:**

Aos meus amores eternos: meu Deus, Razão do meu viver, e meus pais, Eustáquio e Ceci, por fazerem parte da minha vida de forma tão perfeita e doce. Amo vocês muito além do que as palavras podem dizer...

## Agradecimentos

### Agradeço a todos que me ajudaram a realizar esse sonho, em especial:

Ao meu Deus de Amor, Jesus Cristo, meu descanso, conforto, refúgio, escudo e socorro bem presente na tribulação. Ao meu pai, exemplo de competência e dedicação ao trabalho. À minha mãe, profissional exemplar, que a cada dia faz seu melhor com amor.

Aos meus amados irmãos, Alexandre e Daniel, e as minhas cunhadas, Alessandra e Isabella, pela torcida e apoio. Amo muito vocês quatro! Aos meus sobrinhos, Larissa, Guilherme e Mateus por me fazerem muito feliz simplesmente pelo fato de existirem.

Aos meus amadíssimos avós, Feliciano e Zilda, pelo carinho, amor e apoio incondicionais.

Ao meu orientador, professor Renato, pela disponibilidade, acessibilidade, apoio e ensinamentos preciosos.

As minhas queridas amigas e co-orientadoras, Tatiane, Juliana e Érica, que cada uma, a sua maneira, me ajudaram de forma determinante. A Tatiane por ter me ensinado muito e por acreditar em mim. A Juliana por ter me ensinado tanto, por ter me ajudado tanto e por viver minhas preocupações como se suas fossem. A Érica pelo apoio e ensinamentos valiosos, especialmente sobre clonagem.

A minha amiga Taismara por me ajudar a ser uma pessoa melhor... amo você!

Aos professores da Patologia: Ernane, Renato, Roselene, Rogéria, Natália e Roberto pelo carinho, por tudo que me ensinaram durante minha formação e por serem exemplos de competência e dedicação.

A Dra. Renné Tsolis pelos valiosos plasmídeos gentilmente doados. A Mariana Xavier e a Vidya por terem construído estes plasmídeos.

Ao Professor Jenner pela imensa ajuda e pela disponibilidade.

A Professora Marília que generosamente me emprestou o leitor de ELISA novinho.

Ao professor Andrey por me emprestar o aparelho de *Western blot* e pela atenção.

A Fabiana Alves, pela ajuda com purificação de proteína, e Fernanda Oliveira, pela ajuda com a padronização do ELISA, e demais pessoas do Retrolab e da Preventiva, que de alguma forma me ajudaram. Em especial, aos professores Marcos Bryan pelas dúvidas elucidadas e amostras cedidas.

A Ana Patrícia, Mariana Xavier, Teane, Andreia e Valéria pelas amostras cedidas, pelo auxílio e pela amizade preciosa.

A Professora Anna Christina, do ICA (Instituto de Ciências Agrárias de Montes Claros), pelas amostras gentilmente doadas.

A Rejane, pela ajuda na construção das curvas ROC.

Ao Dr. Marco Túlio pela ajuda com o *Western blot*.

A banca examinadora, Profa. Jane Megid, Prof. Jenner Reis, Dr. Marcelo Fernandes Camargos e Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, obrigada pelas considerações que muito contribuíram para a melhoria desse trabalho.

Aos meus amigos que tanto amo, Mário Sérgio, Jankerle, Juneo e Adriana Amantino, obrigada por fazerem parte da minha vida!

A todos da Patologia pela agradável convivência, em especial, Adão, aos meus alunos do 4º período, Auricélio, Luciana, Matheus, Vitor, Laís, Ingrid, Juliana, Amanda Gabrielle, Amanda, Michele, Carlos, Rodrigo e Leimar. Sentirei muitas saudades...

Ao DCCV, Escola de Veterinária e a UFMG, minha segunda casa.

A Eliane Leroy e Luzete, pela ajuda sempre imediata.

Ao Alfredo e a Nina Rosa por fazer meus dias mais divertidos!

A FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos. Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

**A cada um de vocês: muitíssimo obrigada!!!**

---

---

## SUMÁRIO

---

---

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1 Gênero <i>Brucella</i> .....	11
2.2. Infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	12
2.3. Epidemiologia da infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	15
2.4. Marcadores sorológicos da infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	16
2.5. Diagnóstico da infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
Objetivos gerais.....	22
Objetivos específicos.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	23
3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE).....	26
3.3. Material biológico para diagnóstico da infecção por <i>Brucella ovis</i> .....	26
3.4. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para <i>Brucella ovis</i> .....	27
3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) de urina para <i>Brucella ovis</i> .....	27
3.6. Isolamento bacteriano de amostras de urina de carneiro.....	28
3.7. <i>Western blot</i> com BoP59r, BP26r e VirB12r.....	28
3.8. Testes de repetibilidade e reprodutibilidade do ELISA indireto com BoP59r e BP26r.....	28
3.9. ELISA indireto com BP26r.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
4.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	29
4.2. <i>Western blot</i> com BoP59r e BP26r.....	31
4.3. Teste de repetibilidade e reprodutibilidade do ELISA indireto com BoP59r e BP26r.....	31
4.4. ELISA indireto com BP26r.....	34
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 1 -	Sensibilidade e especificidade de ELISAI desenvolvidos para diagnóstico de <i>Brucella ovis</i> .....	21
Tabela 2 -	ELISAI desenvolvidos com BP26 como antígeno para o diagnóstico sorológico de infecções por <i>Brucella</i> spp.....	21
Tabela 3 -	Metodologia para identificação de animais verdadeiro positivo (VP), falso negativo (FN), falso positivo (FP) e verdadeiro negativo (VN).....	29
Tabela 4 -	Valores de média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) obtidos no teste de repetibilidade do ELISAI usando BP26r como antígeno.....	34
Tabela 5 -	Valores de média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) obtidos no teste de reprodutibilidade do ELISAI usando BP26r como antígeno.....	34
Tabela 6 -	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área abaixo da curva ROC do ELISAI BP26r de 55 amostras de carneiros experimentalmente infectados com <i>B. ovis</i> e 41 negativos à IDGA, PCR de urina e isolamento bacteriano, totalizando 96 amostras testadas.....	37

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1 -	Prevalência da infecção por <i>Brucella ovis</i> por regiões de estados da Federação, no período entre 1966 e 2012. Fontes: Maranhão (Chaves et al., 2002), Piauí (Costa et al., 2012), Ceará (Batista et al., 2011), Rio Grande do Norte (Silva et al., 2003; Azevedo et al., 2004), Paraíba (Clementino et al., 2007; Alves et al., 2010; Lima et al., 2012), Pernambuco (Coletto et al., 2003), Alagoas (Pinheiro Júnior et al., 2009), Bahia (Silva et al., 2009; Souza et al., 2011), Minas Gerais (Marques, 2006), Mato Grosso do Sul (Juliano et al., 2011), São Paulo (Nozaki et al., 2004; Rizzo et al., 2009), Paraná (Cunha Filho et al., 2007) e Rio Grande do Sul (Ramos et al., 1966; Blobel et al., 1972; Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996).....	16
Figura 2 -	Plasmídeo de expressão pTrcHis-TOPO usado para expressão e produção de BoP59 recombinante. Amp (R): Cassete que confere resistência à ampicilina. 6 x HIS: sequência para expressão de seis histidinas.....	23
Figura 3 -	Metodologia de clonagem e expressão do <i>bp26</i> . (A) Clonagem do <i>bp26</i> a partir de recombinação homóloga do produto de PCR e plasmídeo linearizado. (B) Plasmídeo pXT7 usado para expressão e produção de BP26 recombinante. Kana (R): Cassete que confere resistência à canamicina para a <i>Escherichia coli</i> BL21. 10 x HIS: sequência para expressão de dez histidinas. (C) Localização do sítio de restrição da enzima <i>BamHI</i> utilizada para linearizar o plasmídeo e sequências do vetor contidas nos iniciadores ( <i>5'-cloning</i> e <i>3'-cloning</i> ). Modificado de Davies e colaboradores (2005).....	24
Figura 4 -	Plasmídeo de expressão, pDS1, usado para expressão e produção de VirB12 recombinante. Amp (R): Cassete que confere resistência à ampicilina para a <i>Escherichia coli</i> BL21. 10 x HIS: sequência para expressão de dez histidinas.....	25
Figura 5 -	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de <i>Escherichia coli</i> BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de BoP59r; BoP59r purificada e marcador de massa molecular para proteínas. Seta: altura da BoP59r, proteína recombinante de 59 kDa.....	30
Figura 6 -	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de <i>Brucella ovis</i> , <i>Escherichia coli</i> BL21 sem plasmídeo de expressão, <i>Escherichia coli</i> BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de BP26r, BP26r purificada e marcador de peso molecular para proteínas. Seta: altura da BP26r, proteína recombinante de 26 kDa.....	30
Figura 7 -	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de <i>Escherichia coli</i> BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de VirB12r e VirB12r purificada. Seta: altura da VirB12r, proteína recombinante de 19 kDa.....	31
Figura 8 -	Membranas de PVDF submetidas a <i>Western blot</i> . Membranas incubadas com soros de carneiros negativo e positivo para <i>Brucella ovis</i> . Seta: altura da BoP59r e cabeça de seta: altura da BP26r e VirB12r.....	31
Figura 9 -	ELISAI utilizando BoP59r purificada. A - 500ng de BoP59 purificada por poço. B - 1 µg de BoP59 purificada por poço. Foram realizadas 10 repetições dos soros em oito diluições, em duplicata, das amostras de soro de um carneiro positivo e um negativo. Não houve diferença estatística significativa entre amostras de carneiro infectado e não infectado.....	32
Figura 10 -	ELISAI utilizando BP26r purificada. A - 500 ng de BP26r purificada por poço. B - 1 µg de BP26r purificada por poço. Foram realizadas 10 repetições dos soros em oito diluições, em duplicata, de um carneiro positivo e um negativo. Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. O valor das médias da amostra positiva foi superior e estatisticamente diferente das médias da amostra negativa, nas oito diluições (p<0,05).....	33



Figura 11 - ELISAI BP26r para diagnóstico de infecção por <i>Brucella ovis</i> em carneiros experimentalmente infectados. Foram testadas, em duplicata, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, 41 amostras de soro de carneiros negativos e 55 amostras de soro de carneiros positivos à IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina. (A) Foram utilizados 500ng de BP26r purificada por poço. Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. (*) e (**) Diferença estatística significativa com valor de $P < 0,05$ . (B) Gráfico de dispersão dos valores de absorbância a 492 nm de amostras de soro de carneiros submetidas ao ELISAI BP26r. A linha contínua representa a média e a linha pontilhada representa o ponto de corte para cada diluição.	36
Figura 12 - Curva ROC de resultados de ELISAI BP26r utilizando amostras de soro de carneiros negativos (n=41) e positivos (n=55) experimentalmente infectados com <i>B. ovis</i> , nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, mostrando sensibilidade versus 1 menos especificidade.....	37
Figura 13 - ELISAI BP26r para diagnóstico de infecção por <i>Brucella ovis</i> utilizando 82 amostras de soro de ovinos negativos à IDGA e 42 amostras positivas à IDGA, em duplicata. (A) Foram utilizados 500 ng de BP26r purificada por poço, testando amostras de soro nas diluições 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. (*) e (**) Diferença estatística significativa com valor de $P < 0,05$ . (B) Gráfico de dispersão dos valores de absorbância a 492 nm de amostras de soro de ovinos submetidas à ELISAI BP26r nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, A linha em preto contínua representa a média e a linha pontilhada em cinza representa o ponto de corte para cada diluição.....	38

---

#### LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 1 - Amostras de carneiros testadas em ensaios de <i>Western blot</i> .....	49
Anexo 2 - Amostras de carneiros negativos e experimentalmente infectados testadas pelo ELISAI BP26r....	50
Anexo 3 - Amostras de ovinos negativos e positivos somente à IDGA testadas pelo ELISAI BP26r.....	57

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS

---

DAB - 3, 3'-diaminobenzidina
EDTA - <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA - <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC - Fixação do complemento
IDGA - Imunodifusão em gel de ágar
IL-1 $\alpha$ - Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$ - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
IPTG - Isopropil $\beta$ -D1 tiogalactopiranosideo
LB - Lauria-Bertani
LPS - Lipopolissacarídeo
MPM - Marcador de peso molecular
OMP - <i>Outer membrane protein</i>
OPD - <i>o-Phenylenediamine</i>
ORF - <i>Open reading frame</i>
PAGE - <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS - <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PNSCO - Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos
PVDF - <i>Polyvinylidene fluoride</i>
ROC - <i>Receiver operating characteristic</i>
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TBS - <i>Tris-buffered saline</i>
TEMED - <i>Tetramethylethylenediamine</i>
VCN - Vancomicina, colistina e nistatina
X-Gal - 5-bromo 4-cloro 3-indol $\beta$ -D galactopiranosideo

## RESUMO

*Brucella ovis* é uma das principais causas de epididimite em carneiros sexualmente maduros, resultando em subfertilidade e infertilidade e consequentes perdas econômicas para a ovinocultura, mundialmente. Contudo, não existe uma técnica para diagnóstico sorológico que apresente boa sensibilidade e especificidade. O objetivo deste estudo foi desenvolver um teste de ELISA indireto (ELISAI) utilizando como antígeno proteínas recombinantes, BoP59r ou BP26r, para diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis*. A antigenicidade de BoP59r e BP26r, produzidas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade, foi testada por *Western blot* e ELISAI. Os testes de repetibilidade e reprodutibilidade do ELISAI foram realizados usando 500 ng e 1 µg de BoP59r e de BP26r por poço, com soros de um carneiro negativo e de um carneiro positivo à IDGA, isolamento bacteriano e PCR de urina, concomitantemente, sendo realizadas 10 repetições independentes. A BoP59r não discriminou ovino negativo de positivo, já a BP26r foi eficiente em diferenciar ovinos negativos de positivos. O ELISAI usando BP26r e soros de carneiros experimentalmente infectados por *B. ovis*, apresentou os melhores índices na diluição de soro de 1:20, com 100% de sensibilidade, 90,2% de especificidade, valor preditivo positivo (VPP) igual a 93,2%, valor preditivo negativo (VPN) igual a 100% e acurácia de 1,0. Em amostras de ovinos positivos somente à IDGA, os melhores resultados foram obtidos na diluição do soro em 1:40, com sensibilidade de 85,7%, especificidade de 85,4%, VPP igual 75%, VPN igual 92,1% e a acurácia foi de 0,9029. Os resultados indicam que a BP26r é um bom marcador sorológico da infecção por *B. ovis* em ovinos.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, ovino, brucelose, ELISAI, BoP59, BP26, *Western blot*, IDGA.

## ABSTRACT

*Brucella ovis* is a major cause of epididymitis in sexually mature rams, resulting in subfertility, infertility, and economic losses for the sheep industry worldwide. The aim of this study was to develop an indirect ELISA (iELISA) using recombinant proteins, namely rBoP59 or rBP26, as antigens for serological diagnosis of *B. ovis* infection. rBoP59 and rBP26 were purified by affinity chromatography and antigenicity of these was tested by Western blot and iELISA. The tests of repeatability and reproducibility were performed with 500 ng and 1 µg of BoP59r or BP26r per well, testing serum from negative and positive rams in AGID, bacteriology and PCR from urine samples, being performed 10 separate repetitions. BoP59r did not discriminate negative from positive, but BP26r was effective in distinguishing positive from negative ram serum samples. The ELISAI with BP26r using sera from rams experimentally infected with *B. ovis* had the highest performance with serum dilution of 1:20, with 100% sensitivity, 90.2% specificity, positive predictive value (PPV) of 93.2%, negative predictive value (NPV) of 100%, and accuracy of 1.0. For serum samples that had been positive by AGID, best results were obtained from the serum dilution at 1:40, the sensitivity was 85.7%, specificity 85.4%, PPV of 75%, VPN of 92.1% and accuracy was 0.9029. And the results indicate that BP26r is a good serological marker for *B. ovis* infection in sheep.

Keywords: *Brucella ovis*, sheep, brucellosis, ELISAI, BoP59, BP26, Western blot, AGID.

## 1. INTRODUÇÃO

*Brucella ovis* é um cocobacilo Gram-negativo que infecta ovinos provocando doença crônica associada a alterações reprodutivas, especialmente epididimite em carneiros sexualmente maduros e, em menor frequência, aborto e nascimento de cordeiros fracos (Burgess, 1982; Xavier et al., 2009). A infecção

por *B. ovis* é a principal causa infecciosa de epididimite em ovinos adultos e consequentemente uma das principais causas de infertilidade (Carvalho Jr. et al., 2010), resultando em prejuízos econômicos importantes para a ovinocultura mundial (Carpenter et al., 1987; Viana e Silveira, 2009).

A associação entre doença reprodutiva em carneiros e infecção por microrganismos do gênero *Brucella* foi descrita pela primeira vez na Nova Zelândia, durante a década de 1950 (Buddle, 1956), e desde então sua ocorrência tem sido relatada em diversos países como Brasil (Ramos et al., 1966; Costa et al., 2012), EUA (Libal e Kirkbride, 1983), Canadá (Buckrell et al., 1985), Argentina (Robles et al., 1998), Espanha (Ficapal et al., 1998) e França (Praud et al., 2012).

A ovinocultura é um dos mais importantes sistemas de criação de animais de produção do mundo, sendo que, em países industrializados, a produção de ovinos é mais significativa que a caprinocultura (Morand-Fehr e Boyazoglu, 1999). No Brasil, a ovinocultura tem apresentado crescimento acelerado e segundo o censo de 2011 possui um rebanho ovino de 17,6 milhões de animais (IBGE, 2011). Esse fato associado à exigência do comércio internacional quanto à sanidade animal, faz com que o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e de controle eficiente de doenças torne-se imprescindível (Marques, 2006; Viana e Silveira, 2009).

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado através de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos são aqueles capazes de comprovar a presença da bactéria na amostra clínica, seja pelo isolamento (Worthington et al., 1985; Santos et al. 2005), ou pela detecção de material genético bacteriano realizado por reações em cadeia da polimerase (PCR) (Manterola et al., 2003; Xavier et al., 2010; Kang et al., 2011). Os métodos indiretos ou sorológicos indicam a presença de anticorpos contra o microrganismo (Nielsen, 2002). Os testes sorológicos, como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Myers e Siniuk, 1970; Myers, 1973; Xavier et al., 2011), a fixação de complemento (FC) (Clapp, 1955; Xavier et al., 2011) e o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto (Chin, 1983; Vigliocco et al., 1997) são os mais utilizados mundialmente para diagnóstico da infecção por *B. ovis* (Burgess, 1982).

Apesar de existirem diversas técnicas para diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis*, nenhuma delas alia sensibilidade e

especificidade elevadas, o que torna necessário a execução de pelo menos dois métodos para aumentar a probabilidade de negativos e positivos serem corretamente identificados (Hilbink et al., 1993; Costa et al., 2012). Desta forma, por ser uma doença economicamente relevante, é desejável o desenvolvimento de um teste sorológico eficiente para diagnóstico de brucelose por *B. ovis* em ovinos.

*Brucella melitensis* é outra espécie de *Brucella* que infecta preferencialmente ovinos e é considerada a mais patogênica para humanos (Xavier et al., 2009). Por isso, em países nos quais há relatos de brucelose por *B. melitensis* o ideal é a utilização de um marcador sorológico específico da infecção por *B. ovis*. Em trabalho realizado por Tsolis e colaboradores (2009), o genoma da *B. ovis* foi totalmente sequenciado, resultando na identificação da ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (BOPI-1), ausente nas *Brucella* spp. clássicas, e que contém o gene *hmg* que codifica uma hemaglutinina putativa (Tsolis et al., 2009), neste estudo denominada BoP59. Como outras hemaglutininas, esta tem potencial para ser um bom marcador sorológico da infecção, como ocorre em casos de doença por *Mycoplasma* spp. (Jacobs, 1993), por *Bordetella pertussis* (Hallander, 1999) e pelo vírus Influenza (Katz et al., 2011). Silva e colaboradores (2011), usando uma cepa mutante de *B. ovis* deficiente no gene *hmg*, concluíram que a hemaglutinina putativa não é importante na patogênese da infecção por *B. ovis* no modelo murino de infecção (Silva et al., 2011), entretanto, seu potencial antigênico ainda não foi avaliado.

Em países livres de *B. melitensis*, como o Brasil, é importante o desenvolvimento de teste sorológico para diagnóstico de brucelose em pequenos ruminantes, mesmo que seja gênero específico. A proteína periplasmática denominada BP26 é sabidamente imunogênica e antigênica, sendo um eficiente marcador sorológico de infecção por *Brucella* spp. em caprinos e humanos, sendo produzida por *B. melitensis* (BMEI0536), *Brucella abortus* (BAB1\_1494), *Brucella suis* (BR1475) (Liang et al., 2010) e *B. ovis* com 100% de homologia entre estas espécies de *Brucella* (Seco-Mediavilla et al., 2003). A proteína BP26, por ser antigênica e altamente conservada dentro do

gênero *Brucella*, tem sido utilizada como antígeno em testes sorológicos como ELISA e *Western blot* para diagnóstico de infecção por *B. abortus* (Rossetti et al., 1996; Tiwari et al., 2011), *B. melitensis* (Cloekaert et al., 1996; Lindler et al., 1996; Cloekaert et al., 2001; Qiu et al., 2012), *B. ovis* (Zygmunt et al., 2002) e *B. suis* (McGiven et al., 2012). A proteína

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Brucella*

*Brucella* spp. são bactérias intracelulares facultativas, que podem sobreviver em fagócitos profissionais e células não fagocíticas de diversas espécies de mamíferos (Gorvel e Moreno, 2002). O gênero *Brucella* pertence à família  $\alpha$ -Proteobacteriaceae e, atualmente, é composto por 10 espécies. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* infectam preferencialmente bovinos, pequenos ruminantes e suídeos, respectivamente, e são as espécies de maior potencial zoonótico. *Brucella canis* infecta caninos e raramente humanos. *Brucella ovis* e *Brucella neotomae* infectam ovinos e rato do deserto, respectivamente, e não possuem potencial zoonótico comprovado (Moreno et al., 2002). Além dessas seis espécies, denominadas clássicas, do gênero *Brucella*, mais recentemente foram isoladas a *Brucella ceti* de cetáceos, a *Brucella pinnipedialis* de pinípedios (Foster et al., 2007), a *Brucella microti* de um roedor silvestre da espécie *Microtus arvalis* (Scholz et al., 2008), a *Brucella inopinata* que foi isolada pela primeira vez de uma prótese mamária humana (Scholz et al., 2010) e a *Brucella* sp. NF2653 de roedor (Wattam et al., 2012). Adicionalmente, dois diferentes isolados, um de primata não-humano (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009) e outro de anfíbio (Eisenberg et al., 2012) foram identificados como pertencentes ao gênero *Brucella* e possivelmente constituirão duas novas espécies. Apesar de possuírem hospedeiros preferenciais, *Brucella* spp. são capazes de infectar outras espécies animais, como por exemplo, *B. suis* e *B. melitensis* também infectam bovinos (Tsolis, 2002; Xavier et al., 2009).

As bactérias do gênero *Brucella* causam doença infecto-contagiosa importante para a saúde pública, por serem agentes etiológicos de uma

recombinante BP26 (BP26r) foi testada como marcador sorológico da infecção por *B. ovis* em carneiros apresentando sensibilidade de 81,8% (Zygmunt et al., 2002). No entanto, até o momento a BP26r não foi testada para diagnóstico de carneiros experimentalmente infectados e que estejam eliminando *B. ovis* no sêmen.

das zoonoses mais relevantes mundialmente. Animais infectados são fonte de infecção para o homem, que se contamina, principalmente, através de contato direto com anexos placentários e ingestão de leite e produtos derivados, como queijos, não pasteurizados. Em relação à saúde animal, a brucelose é responsável por grandes perdas econômicas relacionadas à doença reprodutiva (Xavier et al., 2009). *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. ovis* são as espécies de maior importância econômica, pois resultam em perdas associadas à subfertilidade e infertilidade, que são consequências de aborto, placentite, orquite e epididimite em animais domésticos (Corbel, 1997).

Verger e colaboradores (1985), utilizando técnica de hibridização de DNA, demonstraram que as seis espécies clássicas de *Brucella* spp. apresentam homologia de DNA superior a 95%, sugerindo a classificação do gênero *Brucella* como um gênero mono-específico, sendo *B. melitensis* considerada espécie e as demais espécies atuais, biovars. No entanto, essa proposição não foi aceita no meio científico que considera 10 espécies distintas dentro do gênero *Brucella*. Apesar de cada *Brucella* sp. ser adaptada a um hospedeiro diferente, o genoma de *B. melitensis* difere do genoma de *B. suis* em somente 74 genes. Assim, a comparação entre espécies tão semelhantes pode resultar na identificação de genes únicos que permitem maior entendimento da patogênese da infecção por *Brucella* spp. e elucidação da base genética relacionada à especificidade e interação da *Brucella* spp. com o hospedeiro (Tsolis, 2002). Adicionalmente, a identificação destes genes espécie-específicos pode permitir o desenvolvimento de biotecnologias, como testes sorológicos específicos e vacinas, para as diferentes espécies de *Brucella*.

Tsolis e colaboradores (2009) sequenciaram o genoma completo da amostra ATCC 25840 de *B. ovis* e identificaram, no cromossoma II, uma ilha específica, denominada, posteriormente por Silva e colaboradores (2011), como ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (BOPI-1) que contem 28 ORF (*open reading frames*), inclusive a ORF A0512 que codifica uma hemaglutinina putativa (Tsolis et al., 2009). Apesar da hemaglutinina putativa não ser relevante na patogênese da infecção por *B. ovis* (Silva et al., 2011), esta proteína pode ser importante como antígeno no diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis*, única espécie capaz de infectar ovinos que expressa a hemaglutinina putativa. Apesar de ausente nos genomas das espécies clássicas de *Brucella*, como *B. melitensis* (DelVecchio et al., 2002), *B. suis* (Paulsen et al., 2002) e *B. abortus* (Chain et al., 2005; Halling et al., 2005), BOP-1 foi identificada em amostras de *B. ceti* isoladas de golfinho (Tsolis et al., 2009).

## 2.2. Infecção por *Brucella ovis*

*B. ovis* foi descrita como nova espécie por Buddle (1956), sendo isolada de carneiros na Austrália e Nova Zelândia. Morfologicamente, são pequenos cocobacilos Gram-negativos individuais, medindo de 0,5 a 0,7 µm por 0,6 a 1,5 µm, que raramente formam cadeias curtas, não apresentam cápsula, são imóveis, não formam endosporos e não mostram coloração bipolar. O crescimento ótimo da *B. ovis* ocorre em meio sólido enriquecido com sangue ou soro, quando incubada a 37°C, em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub>. Após cinco dias, as colônias apresentam aproximadamente 2 mm de diâmetro, são circulares, acinzentadas, convexas, brilhantes e macias (Burgess, 1982). *B. ovis* é uma bactéria produtora de catalase, mas que não produz oxidase e urease (Libal e Kirkbride, 1983) e que utiliza como substrato alanina, asparagina e ácido glutâmico. *B. ovis* apresenta LPS incompleto, e por essa razão a morfologia de colônia é rugosa estável, diferindo de espécies naturalmente lisas como *B. abortus* e *B. melitensis* (Alton et al., 1975).

A principal manifestação clínica da infecção por *B. ovis* em carneiros é epididimite, e por esta razão, a doença é também conhecida como epididimite contagiosa ovina (Burgess, 1982).

Esta denominação é inadequada por que apesar de *B. ovis* ser a principal causa de epididimite em carneiros com mais de 18 meses de idade (Walker et al., 1986), a epididimite também pode ser causada por outros agentes bacterianos, como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *Salmonella enterica*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Trueperella pyogenes* (Carvalho Júnior et al., 2010). *B. ovis* é o agente mais isolado de carneiros adultos com alterações patológicas de epidídimo, já em carneiros jovens, os mais frequentes são *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis* e *Trueperella pyogenes* (Walker et al., 1986).

*B. ovis* infecta preferencialmente ovinos (Burgess, 1982), mas existem relatos de infecção natural de cervídeos que coabitavam com carneiros infectados (Kittelberger e Reichel, 1998; Ridler, 2001; Ridler e West, 2002). Carneiros selvagens, após inoculação experimental, apresentaram soroconversão, mas sem apresentar alterações clínicas ou patológicas (Cerri et al., 2002). Burgess e colaboradores (1985) inocularam caprinos com *B. ovis* que soroconverteram e eliminaram *B. ovis* no sêmen, sendo essa uma importante informação epidemiológica, uma vez que é comum a criação de caprinos e ovinos em associação. Dentre os animais de laboratório, o gerbil (Cuba-Caparò e Myers, 1973) e o camundongo (Jiménez de Bagués et al., 1993; Monreal et al., 2003; Silva et al. 2011) são considerados susceptíveis à infecção por *B. ovis* e são utilizados como modelo experimental *in vivo*.

Carneiros infectados por *B. ovis* eliminam a bactéria no sêmen sendo esta a principal fonte de infecção da doença. *B. ovis* pode ser transmitida através do contato entre mucosas nasais, retal, prepucial, peniana e vaginal e secreções de carneiros infectados com ovinos susceptíveis, mantidos no mesmo ambiente (Burgess, 1982). A transmissão entre carneiros pode ocorrer também durante comportamento homossexual, comum nessa espécie (Hartley et al., 1955). Fêmeas em estro também apresentam papel importante na transmissão desse agente ao copular com carneiro infectado que esteja eliminando *B. ovis* no sêmen e, no mesmo período, copular com macho susceptível (Plant et al., 1986). As principais vias utilizadas para

infecção experimental são intraconjuntival (Biberstein et al., 1964), intraprepucial (Plant et al., 1986) ou ambas (Galindo et al., 2009; Xavier et al., 2010; Nozaki et al., 2011; Antunes et al., 2013).

Biberstein e colaboradores (1964) estudaram, por meio de isolamento bacteriano a partir de órgãos em diferentes tempos pós-infecção, a cinética da infecção por *B. ovis* em carneiros inoculados por via intraconjuntival. Em princípio, o agente provoca infecção local na mucosa exposta, por aproximadamente 30 dias, a partir de quando acomete os linfonodos regionais. Bacteremia se instala por volta de dois meses pós-infecção, quando a bactéria atinge o trato genital, baço, rins e fígado, e passa a sobreviver nestes órgãos por tempo indeterminado. Segundo estes autores, a excreção de *B. ovis* no sêmen pode ocorrer por períodos superiores a seis meses em carneiros inoculados via intraconjuntival. Ludford (1972) também demonstrou a presença do agente no sêmen de ovinos experimentalmente infectados, sendo a *B. ovis* ocasionalmente isolada de sítios sistêmicos de infecção como pulmões e linfonodos. Já Xavier e colaboradores (2010), após inoculação experimental de carneiros via intraprepucial e intraconjuntival simultaneamente, demonstraram, através de isolamento bacteriano e PCR, que ocorre eliminação de *B. ovis* na urina a partir de 30 dias, e no sêmen, a partir de 45 dias pós-infecção, sendo tal eliminação intermitente. Esses mesmos autores demonstraram pelo teste de FC que todos os carneiros infectados soroconverteram aos 30 dias de infecção. Aos 180 dias pós-infecção, a presença da bactéria foi demonstrada em diversos tecidos incluindo vesícula seminal, cauda, cabeça e corpo do epidídimo, glândula, prepúcio, testículo, linfonodo ílfaco interno e bexiga, através de isolamento e PCR (Xavier et al., 2010).

Durante o exame clínico de carneiros infectados com *B. ovis*, as alterações mais observadas são assimetria da bolsa escrotal por mudança de conformação e volume dos testículos e epidídimos, aumento de volume da cauda do epidídimo que pode ocupar até 50% do volume escrotal, podendo ser uni ou bilateral. Os testículos podem apresentar bilateral ou unilateralmente consistência macia a flácida ou

consistência firme associada à diminuição de volume em até 50% e o contralateral se apresentar com dimensões e consistência dentro da normalidade (Buckrell et al., 1985).

Subfertilidade é a principal consequência da epididimite ovina causada por *B. ovis* (Buckrell et al., 1985), pois essa infecção resulta em alterações andrológicas importantes como redução da qualidade seminal por diminuição da concentração, volume e motilidade espermática e aumento de patologias espermáticas como cabeça isolada e defeito de peça intermediária (Buckrell et al., 1985; Carvalho Júnior et al., 2012). Leucócitos podem ser visualizados no ejaculado, indicando infecção no trato genital (Buckrell et al., 1985; Carvalho Júnior et al., 2012). O aspirado do epidídimo, apesar de ser composto predominantemente por espermatozoides, pode conter neutrófilos e linfócitos (Buckrell et al., 1985).

As alterações reprodutivas associadas à infecção por *B. ovis* são importantes causas de descarte de reprodutores, inclusive com perda de animais de alto valor zootécnico (Robles, 2008). Além disso, em alguns casos, carneiros assintomáticos e soronegativos podem eliminar *B. ovis* no sêmen, sendo fonte de infecção para o rebanho (Nozaki et al., 2011). Carneiros infectados por *B. ovis* apresentam alterações patológicas restritas ao trato reprodutor, sendo as alterações mais relevantes observadas nos epidídimos (Buckrell et al., 1985). Na fase aguda da infecção, um ou ambos os epidídimos apresentam aumento de volume da cauda, por vezes com áreas focais de aderência fibrinosa entre as faces visceral e parietal da túnica vaginal. Também pode-se observar que um ou ambos os testículos podem estar flácidos, caracterizando degeneração testicular (Buckrell et al., 1985; Carvalho Júnior et al., 2012).

Na fase crônica, uma ou ambas as caudas dos epidídimos apresentam aumento de volume nodular, que podem corresponder a granulomas espermáticos, que ao corte evidenciam áreas de fibrose com superfície de coloração esbranquiçada devido proliferação de tecido conjuntivo com formações cavitárias delimitadas por tecido conjuntivo denso organizado, e preenchidas por exsudato caseoso (Carvalho Júnior et al., 2012). Observam-se,

ainda, pontos de aderência fibrosa entre as faces visceral e parietal da túnica vaginal ou entre a face visceral da túnica vaginal do epidídimo e o testículo ipsilateral. Um ou os dois testículos podem estar diminuídos de volume e de consistência firme (Buckrell et al., 1985; Searson, 1987). Importante salientar que as alterações testiculares são secundárias à inflamação no epidídimo ipsilateral, que compromete a termorregulação testicular (Buckrell et al., 1985).

Histologicamente, observa-se inicialmente no epidídimo afetado edema perivascular e infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos especialmente ao redor de vasos sanguíneos. Com a evolução do processo infeccioso, observa-se infiltrado de linfócitos e neutrófilos e fibrose intersticial. Os ductos da cauda do epidídimo apresentam degeneração epitelial, formação de cistos intra-epiteliais e no lúmen, além de espermatozoides, neutrófilos, linfócitos e células epiteliais descamadas (Buckrell et al., 1985). Por vezes, ocorre ruptura do ducto epididimário e consequente extravazamento de espermatozoides para o interstício que resulta na formação de granuloma espermático (Carvalho Júnior et al., 2012). Os granulomas espermáticos são compostos por aglomerados de espermatozoides, delimitados por linfócitos, macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas e, mais externamente, por tecido conjuntivo fibroso denso (Buckrell et al., 1985; Foster et al., 1987). O interstício da cabeça e corpo do epidídimo pode apresentar infiltrado inflamatório discreto a moderado de plasmócitos e neutrófilos (Buckrell et al., 1985). Nos testículos, a alteração mais observada é a diminuição da espermatogênese em diferentes intensidades, resultando em degeneração e hipotrofia testiculares (Searson, 1987).

Frequentemente, carneiros infectados por *B. ovis* com lesão de epidídimo apresentam inflamação em glândulas reprodutivas acessórias, particularmente nas vesículas seminais e ampolas dos ductos deferentes (Foster et al., 1987; Searson, 1987, Carvalho Júnior et al., 2012). No lúmen e no interstício de vesículas seminais e ampolas, pode-se observar acúmulo discreto a moderado de plasmócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Buckrell et

al., 1985; Foster et al., 1987, Carvalho Júnior et al., 2012).

Galindo e colaboradores (2009) demonstraram que carneiros infectados por *B. ovis* apresentam aumento da expressão de genes pró-inflamatórios em leucócitos. Em estudo recente, Antunes e colaboradores (2013) observaram que, durante a fase aguda da doença, até 30 dias pós-infecção, tecidos do trato reprodutor, em especial epidídimos, testículos, glândulas bulbo-uretrais e ampolas, aumentam a expressão gênica de citocinas, como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . No entanto, durante a fase crônica, entre os dias 120 e 240 pós-infecção, ocorre diminuição da expressão dessas citocinas até níveis basais nos órgãos reprodutores, com exceção de epidídimo e glândulas bulbo-uretrais, nos quais ocorre diminuição de expressão, mas esta permanece acima do normal. Sugere-se que os baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias na fase crônica, permitem a persistência da infecção nos tecidos do trato reprodutor e consequentemente desenvolvimento da doença crônica. Isso pode indicar a existência de um mecanismo de evasão da resposta imunológica (Antunes et al., 2013).

Ovelhas não gestantes infectadas por *B. ovis* podem apresentar vaginite e endometrite. Já em ovelhas gestantes, a infecção pode resultar em placentite, mais intensa em áreas intercotiledonárias, caracterizada pelo acúmulo de exsudato fibrinoso e edema das membranas placentárias (Libal e Kirkbride, 1983). Histologicamente, observa-se edema e infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos, caracterizando placentite purulenta multifocal aguda, além de cocobacilos pequenos livres e no citoplasma de trofoblastos, e áreas focais de necrose (Mollelo et al., 1963; Libal e Kirkbride, 1983), podendo ocorrer aborto no terço final da gestação (Libal e Kirkbride, 1983). No feto, macroscopicamente, pode-se observar peritonite fibrinosa. Enquanto que, microscopicamente, observa-se pneumonia e bronquiolite purulentas focais (Libal e Kirkbride, 1983) e hepatite periportal purulenta discreta (Osburn e Kennedy, 1966; Osburn, 1968). Geralmente nestes casos, os fetos apresentam altos títulos de anticorpos anti-*B. ovis* (Osburn e Kennedy, 1966).

### 2.3. Epidemiologia da infecção por *Brucella ovis*

A epididimite por *B. ovis* é a causa mais importante de doença reprodutiva infecciosa em ovinos (Burgess et al., 1982). A brucelose ovina causada por *B. ovis* apresenta distribuição mundial em áreas nas quais a ovinocultura apresenta importância econômica, como por exemplo: Nova Zelândia (Buddle, 1956), Austrália (Buddle, 1956; Cox et al., 1977), Brasil (Ramos et al., 1966; Costa et al., 2012), Estados Unidos da América (Libal e Kirkbride, 1983); Canadá (Buckrell et al., 1985; Niilo et al., 1986), Argentina (Robles et al., 1998; López et al., 2006), Espanha (Ficapal et al., 1998), México (Nárez et al., 1999), Eslováquia (Kováčová et al., 2007), Croácia (Spicic et al., 2010) e França (Praud et al., 2012).

O Brasil é considerado país livre de brucelose em pequenos ruminantes causada pela *B. melitensis*, no entanto, a infecção pela *B. ovis* já foi descrita em diversos estados brasileiros (Santiago et al., 2012). A infecção foi descrita pela primeira vez no Rio Grande do Sul (Ramos et al., 1966; Blobel et al., 1972; Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996) e posteriormente no Maranhão (Chaves et al., 2002), Pernambuco (Coletto et al., 2003), Rio Grande do Norte (Silva et al., 2003; Azevedo et al., 2004), São Paulo (Nozaki et al., 2004; Rizzo et al., 2009), Minas Gerais (Marques, 2006), Paraíba

(Clementino et al., 2007; Alves et al., 2010; Lima et al., 2012), Paraná (Cunha Filho et al., 2007), Alagoas (Pinheiro Júnior et al., 2009), Bahia (Silva et al., 2009; Souza et al., 2011), Ceará (Batista et al., 2011), Mato Grosso do Sul (Juliano et al., 2011) e Piauí (Costa et al., 2012).

Com base na literatura disponível, a prevalência estimada da infecção por *B. ovis* em ovinos em diferentes estados do país está ilustrada na Figura 1. Claramente observa-se que o estudo da prevalência da doença concentra-se na região Nordeste, que possui mais de 50% do efetivo do rebanho ovino no Brasil (Simplício, 2011). Devido a sua importância econômica, a infecção por *B. ovis* é contemplada pelo Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Governo Federal Brasileiro. A maioria de estudos de prevalência no Brasil utiliza o IDGA como único teste diagnóstico (Coletto et al., 2003; Silva et al., 2003; Azevedo et al., 2004; Cunha Filho et al., 2007; Pinheiro Júnior et al., 2009; Rizzo et al., 2009; Chiebao e Thomazella, 2011; Juliano et al., 2011; Souza et al., 2011). Contudo, a sensibilidade deste teste é variável e, frequentemente animais que eliminam a *B. ovis* no sêmen são negativos à IDGA (Nozaki et al., 2011; Xavier et al., 2011). Desta forma, provavelmente, a real prevalência dessa doença no Brasil é superior ao mostrado na Figura 1.



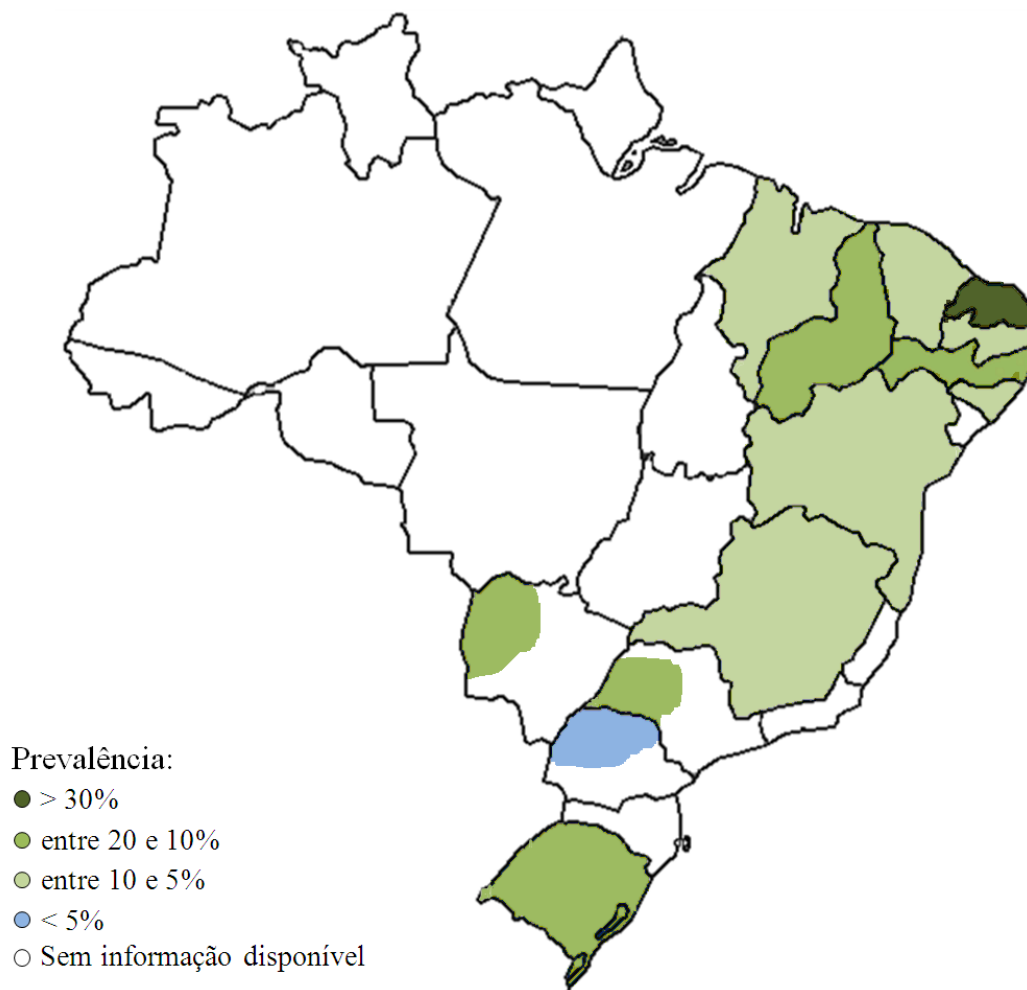


Figura 1: Prevalência da infecção por *Brucella ovis* por regiões de estados da Federação, no período entre 1966 e 2012. Fontes: Maranhão (Chaves et al., 2002), Piauí (Costa et al., 2012), Ceará (Batista et al., 2011), Rio Grande do Norte (Silva et al., 2003; Azevedo et al., 2004), Paraíba (Clementino et al., 2007; Alves et al., 2010; Lima et al., 2012), Pernambuco (Coletto et al., 2003), Alagoas (Pinheiro Júnior et al., 2009), Bahia (Silva et al., 2009; Souza et al., 2011), Minas Gerais (Marques, 2006), Mato Grosso do Sul (Juliano et al., 2011), São Paulo (Nozaki et al., 2004; Rizzo et al., 2009), Paraná (Cunha Filho et al., 2007) e Rio Grande do Sul (Ramos et al., 1966; Blobel et al., 1972; Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996).

#### 2.4. Marcadores sorológicos da infecção por *Brucella ovis*

Durante o curso da infecção por *B. ovis*, anticorpos são produzidos especialmente contra o LPS rugoso e uma gama de proteínas. Assim, o LPS rugoso (Afzal et al., 1983; Chin, 1983; Riezu-Boj et al., 1986; Estein et al., 2002), proteínas (Gamazo et al., 1989; Kittelberger et al., 1995) e até a bactéria inteira (Chin, 1983) têm sido usados como antígenos em testes sorológicos. Algumas proteínas são altamente

antigênicas, como uma proteína de membrana externa (OMP, *outer membrane protein*) de 29 kDa, imunodominante que permite a identificação de anticorpos em 100% dos animais infectados e em nenhum animal sadio por meio de *Western blot* (Kittelberger et al., 1995). Dentre os marcadores testados, estão ainda antígenos solúveis (Estein et al., 2002), frações proteicas superficiais, como OMPs, e proteínas citosólicas, obtidos por aquecimento e posterior centrifugação de suspensões salinas de *B. ovis* (Riezu-Boj et al., 1986; Estein et al.,

2002) e antígenos citosolúveis obtidos por cromatografia líquida fracionada (Chin e Pang-Turner, 1990). As OMPs, também denominadas proteínas de superfície, são proteínas que compõem a membrana externa de bactérias como a *B. ovis* e algumas são reconhecidas antigênicas, como OMP31 (Vizcaíno et al., 2001; Martín-Martín et al., 2009) e OMP25 (Caro-Hernández et al., 2007; Martín-Martín et al., 2009), sendo utilizadas como marcadores sorológicos de infecção (Caro-Hernández et al., 2007; Vizcaíno et al., 2001; Martín-Martín et al., 2009). Comparando a eficiência antigênica de diferentes marcadores sorológicos da infecção por *B. ovis*, os mais eficientes são as proteínas, como OMPs e proteínas citosólicas (Estein et al., 2002), e antígenos de suspensões salinas de *B. ovis* (Riezu-Boj et al., 1986; Marín et al., 1989). Antígenos das espécies rugosas de *Brucella*, *B. canis* e *B. ovis*, apresentam reação cruzada em diagnóstico sorológico, e por essa razão, o antígeno de *B. canis* pode ser usado para o diagnóstico de infecção por *B. ovis* (Alton et al., 1975; Nielsen, 2002; López et al., 2006).

A forma de extração e o tipo do antígeno utilizado como marcador sorológico da infecção por *B. ovis* são determinantes na eficiência dos testes sorológicos (Chin, 1983; Marín et al., 1989). A forma de extração mais utilizada para produzir antígenos a serem usados em ensaios de IDGA e de FC é conhecida como extração por salina quente (Marín et al., 1989; Ficapal et al., 1998; Coletto et al., 2003; Azevedo et al., 2004; Chiebao e Thomazella, 2011; Xavier et al., 2011). Nesta técnica, o antígeno é obtido através de suspensão salina de células bacterianas, aquecimento e posterior centrifugação e liofilização. Antígenos solúveis também podem ser obtidos pela extração por salina fria, que utiliza células desidratadas pela acetona e solução de cloreto de sódio. O LPS rugoso da *B. ovis* pode ser extraído após a ressuspensão de células bacterianas desidratadas em solução de fenol, clorofórmio e éter de petróleo, com posterior liofilização (Marín et al., 1989).

No entanto, seja qual for a técnica utilizada para extração de antígeno a partir da bactéria inteira, o antígeno final será composto por proteínas diversas e carboidratos (Chin e Turner, 1990), o

que pode comprometer sua eficiência antigênica. Uma opção é utilizar técnicas de DNA recombinante para produção *in vitro* de proteínas recombinantes usadas em testes diagnósticos, em especial ensaios de ELISA (Cloekaert et al., 2001; Tiwari et al., 2011). A vantagem desta técnica é permitir testar a antigenicidade específica de proteínas recém-identificadas (Cloekaert et al., 1996; Letesson et al., 1997; Vizcaíno et al., 2001; Qiu et al., 2012) ou regiões imunodominantes de proteínas sabidamente antigênicas produzidas durante o curso da infecção (Tiwari et al., 2011).

A proteína periplasmática BP26 é identificada como marcador sorológico de infecção por *B. melitensis* em humanos (Lindler et al., 1996; Liang et al., 2010), ovinos (Cloekaert et al., 1996; Seco-Mediavilla et al., 2003) e caprinos (Gupta et al., 2010; Liang et al., 2010); por *B. abortus* em bovinos (Rossetti et al., 1996; Connolly et al., 2006) e *B. ovis* em ovinos (Zygmunt et al., 2002; Seco-Mediavilla et al., 2003). Desta forma, a BP26 é sabidamente imunodominante em bovinos, ovinos, caprinos e humanos (Cloekaert et al., 1996; Debarh et al., 1996; Lindler et al., 1996). Além disso, uma região imunodominante recombinante da BP26 foi eficiente em identificar bovinos infectados por *B. abortus* (Tiwari et al., 2011). Apesar do gene *bp26* ser conservado entre as espécies clássicas de *Brucella* (Seco-Mediavilla et al., 2003; Liang et al., 2010), Cloekaert e colaboradores (2000) demonstraram que o pleomorfismo do gene *bp26* permite a distinção entre amostras de *Brucella* spp. isoladas de animais marinhos e de cepas terrestres. Outro fato interessante é que a amostra vacinal Rev.1 de *B. melitensis* mutante para *bp26* é eficiente na prevenção da infecção por *B. ovis* em camundongos (Cloekaert et al., 2004) e ovinos (Grilló et al., 2009). *Escherichia coli* expressando BP26 também é eficiente na prevenção de infecção por *B. melitensis* em camundongos (Gupta et al., 2012), e ainda, vesículas de membrana externa de *B. melitensis* contendo proteínas, inclusive BP26, protegem camundongos da infecção por este agente (Avila-Calderón et al., 2012).

A proteína VirB12 é um dos componentes do sistema de secreção tipo IV, principal fator de virulência de *Brucella* spp., codificado pelo

operon *virB*, composto por 12 genes e conservado no genoma do gênero *Brucella* (Boschiroli et al., 2002). O *virB12* é um dos genes que compoem o operon *virB* e sabidamente é expresso durante a infecção, mas a proteína VirB12 não é essencial ao sistema de secreção tipo IV (Sun et al., 2005), sendo dispensável a partir de quatro semanas para a persistência da infecção por *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* em camundongos, ou seja, a VirB12 não é essencial para a persistência da infecção por estas espécies de *Brucella* patogênicas em seres humanos e camundongos. No entanto, a VirB12 é um marcador sorológico de infecção por *B. abortus* em bovinos e da infecção por *B. melitensis* em caprinos (Rolán et al., 2008). Em camundongos a VirB12 também é capaz de sinalizar a infecção por *B. abortus* (Rolán et al., 2008). No entanto, até o momento, a VirB12 não foi testada como marcador sorológico da infecção por *B. ovis* em ovinos.

A proteína hemaglutinina putativa ou BoP59 é exclusiva da *B. ovis* e por essa razão foi escolhida para estudo como potencial marcador sorológico que poderia permitir o diagnóstico específico da infecção por *B. ovis*. A BoP59 é expressa pelo gene *hmg* (BOV\_A0512) localizado no cromossomo II de *B. ovis* (número de acesso no GenBank NC\_009504). BoP59r é composta por 580 aminoácidos e uma cauda de seis histidinas; sua massa molecular é igual a 59,66 kDa, segundo o programa disponível em: [www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). Até o momento, a antigenicidade desta proteína não foi testada.

## 2.5. Diagnóstico da infecção por *Brucella ovis*

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* pode ser realizado através da associação de exames clínicos, métodos diretos, capazes de identificar o agente (isolamento) ou seu DNA (PCR), e métodos indiretos, como os testes sorológicos. O sucesso no diagnóstico está diretamente relacionado à qualidade da amostra biológica a ser testada e ao teste empregado (Mol et al., 2012).

O diagnóstico clínico da epididimite por *B. ovis* em carneiros é baseada em exame andrológico que pode incluir palpação escrotal, de testículos e epidídimos e avaliação citológica de sêmen. A

avaliação do sêmen fresco permite análise morfológica e funcional de espermatozoides. Esfregaço de sêmen corado pela técnica de Gram ou Ziehl-Neelsen modificado pode evidenciar a presença de células inflamatórias e de pequenos cocobacilos, o que sugere infecção por *B. ovis*. A avaliação andrológica permite a detecção de alterações macroscópicas associadas à diminuição da fertilidade, e microscópicas, que podem indicar alto índice de patologia espermática ou processo inflamatório e infeccioso (Robles, 2008). O exame clínico apresenta baixo custo, fácil execução em condições de campo, mas, no entanto, a palpação escrotal é ineficiente em identificar infecções crônicas não associadas à lesão macroscópica e não permite diferenciar epididimite causada por outros agentes infecciosos (Webb et al., 1980). Células inflamatórias em esfregaços de sêmen são também observadas em casos de epididimite por diferentes patógenos (Burgess, 1982).

Sêmen é a amostra de escolha para diagnóstico direto de infecção por *B. ovis*, seja pelo isolamento bacteriano ou pela PCR (Materola et al. 2003, Xavier et al., 2010). Adicionalmente, urina e lavado prepucial podem ser utilizados como amostras alternativas para detecção direta do agente (Xavier et al., 2010). Contudo, a eliminação do agente seja no sêmen ou na urina e sua recuperação em lavado prepucial tem se mostrado intermitente ao longo do curso da infecção. Tecidos do trato reprodutor obtidos após castração ou em abatedouro, como epidídimo e vesícula seminal, podem auxiliar no diagnóstico definitivo da infecção (Xavier et al., 2010). A coleta de amostra para isolamento de *B. ovis* deve ser feita de forma asséptica e com material esterilizado. As amostras devem ser imediatamente refrigeradas e enviadas ao laboratório em um prazo de 12 horas (Robles, 2008). O sucesso no isolamento depende ainda do número de bactérias viáveis na amostra clínica, armazenamento adequado e rápido envio das amostras clínicas ao laboratório (Mol et al., 2012). Para realização da PCR, por sua vez, não é necessário que o microrganismo esteja viável (Xavier et al., 2010).

O isolamento de *B. ovis* é considerado o método para diagnóstico definitivo (Alton et al., 1975; Robles, 2008), e em carneiros pode ser realizado

a partir de cultivo bacteriano de sêmen (Robles, 2008), urina, lavado prepucial (Xavier et al., 2010) e amostras de tecido, principalmente, de cauda do epidídimo e vesículas seminais (Searson, 1986; Xavier et al., 2010). A identificação da bactéria no sêmen é o diagnóstico definitivo, no entanto, um resultado negativo não é conclusivo, pois a eliminação do agente é intermitente e alguns carneiros infectados não eliminam *B. ovis* no sêmen durante o curso da infecção (Burgess, 1982). Além disso, o isolamento é um processo laborioso, demorado e requer bactéria viável na amostra (Bricker, 2002). Em casos de aborto em ovelhas, devem ser coletadas para isolamento amostras de placenta, anexos placentários, pulmão e conteúdo do abomaso de feto abortado. Em casos de aborto no terço final de gestação deve-se fazer diagnóstico diferencial com outras espécies de *Brucella*, *Chlamydia* spp., *Trueperella pyogenes*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. (Libal e Kirkbride, 1983).

Amostras biológicas coletadas para cultivo bacteriano devem ser coletadas de forma mais asséptica possível, pois o crescimento de outros microrganismos pode inibir o crescimento da *B. ovis*. Para crescimento ótimo de *B. ovis* é recomendado cultivo em meio sólido a base de GC (ágar chocolate), hemoglobina, suplemento antibiótico VCN (vancomicina, colistina e nistatina) e antibiótico nitrofurantoína que diminuem o crescimento de contaminantes (Brown et al., 1971; Alton et al., 1975).

Diferentes tipos de PCRs têm sido desenvolvidos, como a PCR que identifica microrganismos do gênero *Brucella* (Manterola et al., 2003), a PCR específica para *B. ovis* (Xavier et al., 2010) e a PCR *nested* espécie-específica com elevada sensibilidade para diagnóstico da infecção por *B. ovis* em carneiros (Costa et al., 2013). Técnicas de PCR multiplex, como AMOS (Bricker and Halling, 1994) e Bruce-Ladder (Kang et al., 2011), são capazes de identificar e diferenciar espécies e biotipos de *Brucella* spp., inclusive *B. ovis*. Existe ainda a PCR HOOF-Prints baseada em VNTR

(*variable number tandem repeats*) que é capaz de distinguir as espécies e biovariedades de *Brucella* (Bricker et al., 2003; Bricker e Ewald, 2005). Outra opção diagnóstica é a PCR-RFLP, baseada na identificação do polimorfismo de genes que codificam OMPs de *Brucella* spp. (Cloekaert et al., 1995; Vizcaíno et al., 1997). Além das PCR convencionais, pesquisadores desenvolveram PCR genérica em tempo real, que é um método mais rápido, além de ser quantitativo (Winchell et al., 2010).

Métodos indiretos, como testes sorológicos, são capazes de identificar anticorpos anti-*B. ovis* no soro de animais infectados. Para isso, amostras de sangue devem ser coletadas com cautela, para evitar hemólise, e, imediatamente após a coleta, o soro deve ser separado, aliquotado, congelado e enviado ao laboratório (Robles, 2008). Entretanto, sabe-se que animais que eliminam *B. ovis* no sêmen ou urina podem ser soronegativos em testes sorológicos rotineiros (Nozaki et al., 2011). Em ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis*, a soroconversão ocorre a partir de 15 dias pós-infecção (Xavier et al., 2010) e observa-se uma diminuição progressiva do título de anticorpos anti-*B. ovis* durante o curso da doença até se tornarem soronegativos a partir da 34ª semana pós-infecção (Nozaki et al., 2011). Tal fato é preocupante uma vez que a brucelose ovina por *B. ovis* é uma doença tipicamente crônica. O controle e erradicação da brucelose por *B. ovis* depende da eficiência dos testes diagnósticos em identificar corretamente os infectados, para que não disseminem o agente, e os não infectados, para evitar descarte desnecessário de ovinos (West e Bruce, 1991).

Os testes sorológicos são os mais utilizados mundialmente para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* (Burgess, 1982). A técnica de IDGA foi desenvolvida por Myers e Siniuk (1970) e desde então é um dos métodos diagnósticos mais utilizados. A sensibilidade da IDGA é variável, podendo apresentar valores entre 50% (Xavier et al., 2011) e 100% (Cerri et al., 2000). Já a especificidade da IDGA é considerada alta, variando entre 96,6% (Estein et al., 2002) e 100% (Worthington et al., 1984; Marín et al., 1989; Núñez-Torres et al., 1998; Cerri et al., 2000; Xavier et al., 2011). O fator determinante para sensibilidade e especificidade apresentada

pela IDGA é o antígeno utilizado (Myers et al., 1972; Núñez-Torres et al., 1998). Ensaio de IDGA são de fácil execução, práticos, de baixo custo e podem ser realizados a campo. A principal desvantagem da IDGA é o alto número de falso-negativos (Nozaki et al., 2011; Xavier et al., 2011). Segundo a literatura consultada, a IDGA pode apresentar sensibilidade semelhante (Myers et al., 1972; Myers, 1973; Jones et al., 1975) ou menor que a FC (Worthington et al., 1984), no entanto, pode ser mais eficiente no diagnóstico sorológico dessa infecção (Marín et al., 1989; Hilbink et al., 1993; Xavier et al., 2011). Esta variação de resultados possivelmente está relacionada à fase da infecção em que a amostra é coletada (Xavier et al., 2011).

A técnica de FC para diagnóstico da infecção por *B. ovis* foi descrita inicialmente por Clapp (1955), e desde então tem sido utilizada mundialmente inclusive em programas de erradicação da brucelose ovina por *B. ovis*, em função de sua eficiência diagnóstica (Burgess, 1982; West e Bruce, 1991). Adicionalmente, FC é o teste aceito para diagnóstico de infecção de *B. ovis* para o trânsito internacional de ovinos pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) (Kováčová et al., 2007). A FC apresenta valores de sensibilidade entre 54,3% (Rahaley et al., 1983) e 98,7% (Cerri et al., 2000) e de especificidade entre 98,5% (Rahaley et al., 1983) e 100% (Marín et al., 1989; Cerri et al., 2000; Xavier et al., 2011). É um teste de execução complexa, exigindo capacitação técnica, além da ocorrência do fenômeno de

prozona, que está associado à resultados falso-negativos (Searson, 1982; Rahaley et al., 1983; Ris et al., 1984). A FC necessita de inativação do soro pelo calor, apresenta incompatibilidade com soro hemolisado ou anticomplementar, apresentando diminuição da sensibilidade (Searson, 1982; Rahaley et al., 1983; Ris et al., 1984; Spencer e Burgess, 1984) e alto índice de falso-negativo em soros de ovinos com infecção crônica (West e Bruere, 1993, Xavier et al., 2011). Adicionalmente, ovinos que possuem anticorpos anti-*Actinobacillus seminis* podem apresentar resultado falso-positivo para *B. ovis* no teste de FC (Rahaley et al., 1983).

O primeiro ELISAI para diagnóstico da infecção por *B. ovis* foi desenvolvido por Chin (1983) que testou como antígeno *B. ovis* inteira, LPS e componentes do complexo de membrana externa de *B. ovis*. A maior sensibilidade foi obtida com a bactéria inteira. Desde então diferentes antígenos e protocolos têm sido testados (Chin, 1983; Rahaley et al., 1983; Afzal et al., 1984; Ris et al., 1984; Worthington et al., 1984; Lee et al., 1985; Cho e Niilo, 1987; Marín et al., 1989; Núñez-Torres et al., 1997; Vigliocco et al., 1997; Cerri et al., 2000; Estein et al., 2002; Zygmunt et al., 2002; Gall et al., 2003; Nielsen et al., 2007; Praud et al., 2012) e os resultados obtidos indicaram que o ELISAI é um teste sensível, mas que sua eficiência está diretamente relacionada ao antígeno utilizado (Chin, 1983; Rahaley et al., 1983). As informações sobre os principais ELISAI testados para diagnóstico da infecção por *B. ovis* em ovinos estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sensibilidade e especificidade de ELISAI desenvolvidos para diagnóstico de *Brucella ovis*.

ELISAI				
Antígeno	Sensibilidade (%) (S)	Especificidade (%) (E)	Teste usado para comparação	Referência
Antígenos extraídos pela técnica de salina quente (HS)	100,0	100,0	FC <sup>1</sup>	Ris et al., 1984
	97,2	98,6	FC (S=96,3% e E=99,3%) IDGA (S= 91,7% e E=100%)	Worthington et al., 1984
	97,6	100,0	FC (S= 92,7% e E=100%) IDGA (S= 96,4% e E= 100%)	Marín et al., 1989
	97,0	84,0	Isolamento bacteriano <sup>1</sup> IDGA (S=100% e E=100%)	Núñez-Torres et al., 1997
	100,0	100,0	FC (S=98,7% e E=100%) WB (S=97,4% e E=100%)	Cerri et al., 2000
	96,2	96,6	IDGA (S=88,9% e E=71,3%)	Estein et al., 2002
	91,7	95,2	FC (S= 86% e E=98,8%)	Praud et al., 2012
<i>B. ovis</i> inteira	100,0	99,4	FC (S=97,5% e E=96%)	Cho e Niilo, 1987
	96,4	100,0	FC (S=88,9% e E=99,7%)	Vigliocco et al., 1997
	67,1	100,0	FC (S= 54,3 % e E= 98,5 %)	Rahaley et al., 1983
LPS	94,7	100,0	FC (S= 84,2% e E=100%)	Afzal et al., 1984
	96,3	99,6	FC <sup>1</sup>	Gall et al., 2003
	*LPSc: 98,8 **LPSp: 99,4	LPSc: 99,8 LPSp: 93,8	NR	Nielsen et al., 2007
BP26	81,8	ND	NR	Zygmunt et al., 2002

<sup>1</sup>: valores de sensibilidade e especificidade não determinados. ND: não determinado. NR: não realizado.  
\*LPSc: LPS rugoso comercial; \*\*LPSp: LPS rugoso produzido pelos autores do trabalho.

Tabela 2: ELISAI desenvolvidos com BP26 como antígeno para o diagnóstico sorológico de infecções por *Brucella* spp.

<i>Brucella</i> spp.	Hospedeiro preferencial	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Referência
<i>B. melitensis</i>	Ovino	88,0 a 100,0	93,0	Cloekaert et al., 1996; Cloekaert et al., 2001
	Caprino	87,5	90,0	Gupta et al., 2010
<i>B. ovis</i>	Ovino	81,8	ND	Zygmunt et al., 2002
<i>B. abortus</i>	Bovino	28,6 a 70,3	86,3 a 100,0	Connolly et al., 2006; Tiwari et al., 2011
<i>B. suis</i>	Suíno	50,0	85,1	McGiven et al., 2012

ND: não determinado

Na Tabela 2 estão sumarizadas as informações de diferentes ELISAI utilizando BP26 como antígeno que foram desenvolvidos para diagnóstico sorológico da infecção por *B. melitensis* em ovinos (Cloeckart et al., 1996, Cloeckart et al., 2001) e em caprinos (Gupta et al., 2010); por *B. abortus* em bovinos (Connolly et al., 2006; Tiwari et al., 2011); por *B. suis* em suínos (McGiven et al., 2012) e da infecção por *B. ovis* em ovinos (Zygmunt et al., 2002) (Tabela 2).

O ELISAI para diagnóstico da infecção por *B. ovis* apresenta melhor sensibilidade e especificidade que FC e IDGA (Rahaley et al., 1983; Ris et al., 1984; Spencer e Burgess, 1984; Lee et al., 1985). O teste de ELISAI tem as vantagens de apresentar a leitura objetiva dos resultados por espectrofotometria, ser econômico por utilizar pequenas quantidades de reagentes e soro, ser parcialmente automatizado e ser capaz de avaliar um grande número de amostras simultaneamente (Robles, 2008). A desvantagem do ELISAI está relacionada à falta de padronização dos testes (Rahaley et al., 1983). A sensibilidade do ELISAI para *B. ovis* pode variar entre 67,1% (Rahaley et al., 1983) e 100% (Ris et al., 1984; Cho e Niilo, 1987; Cerri et al., 2000) e a especificidade entre 84% (Núñez-Torres, 1997) e 100% (Rahaley et al., 1983; Ris et al., 1984; Martín et al., 1989; Vigliocco et al., 1997; Cerri et al., 2000) (Tabela 1).

O ELISAI utilizando antígenos extraídos pela técnica da salina quente mostrou maior sensibilidade que a IDGA (Worthington et al., 1984; Marín et al., 1989) e que a FC (Worthington et al., 1984; Marín et al., 1989; Cerri et al., 2000; Praud et al., 2012) e menor especificidade que a IDGA (Worthington et al., 1984). Riezu-Boj e colaboradores (1986) compararam a eficiência de antígenos extraídos pela técnica da salina quente e LPS de *B. ovis* em ELISAI. Os antígenos extraídos com salina quente identificaram maior número de carneiros infectados por *B. ovis* (maior sensibilidade), no entanto, apresentaram maior frequência de reação cruzada (menor especificidade) em soros de ovinos infectados com *B. melitensis*. Pesquisadores demonstraram que ELISAI usando LPS rugoso como antígeno é mais sensível (sensibilidade entre 94,7 e 99,4%) que a FC (84%) (Afzal et al., 1984) e apresenta

especificidade de 100%, igual a do teste de FC (Afzal et al., 1984; Marín et al., 1989; Cerri et al., 2000) e IDGA (Cerri et al., 2000) no diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis* em carneiros. Rahaley e colaboradores (1983) mostraram que o ELISAI usando como antígeno a bactéria inteira lisada apresenta maiores sensibilidade e especificidade que a FC (Tabela 1).

Um ELISAI para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* usando como antígeno BP26r ou extrato de antígenos solúveis de *B. ovis* Reo 198 foi desenvolvido por Zygmunt e colaboradores (2002). Utilizando soro de carneiros com resultado positivo ao isolamento bacteriano para *B. ovis*, o ELISAI com BP26r (sensibilidade 81,8%) foi menos eficiente que o extrato de Reo 198 (sensibilidade 100%) no diagnóstico da infecção (Zygmunt et al., 2002).

*Western blot* é uma técnica que pode ser utilizada como método sorológico de imunodiagnóstico e que apresenta sensibilidade entre 97,4% (Cerri et al., 2000) e 98,6% (Kittelberger e Reichel, 1998) e especificidade entre 99,1% (Kittelberger e Reichel, 1998) e 100% (Cerri et al., 2000). Contudo, esta técnica tem sido utilizada apenas como ferramenta de pesquisa, pois é complexa, onerosa e necessita de pessoal treinado para sua execução. Lindler e colaboradores (1996) demonstraram que o *Western blot* usando BP26 foi eficiente no diagnóstico sorológico da infecção por *B. melitensis* em humanos.

## OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um teste sorológico para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* em ovinos.

### Objetivos específicos

- I. Produzir e purificar as proteínas recombinantes BoP59, BP26 e VirB12;
- II. Avaliar a antigenicidade de BoP59 e BP26 por *Western blot* e ELISA indireto;
- III. Padronizar ELISA indireto usando antígeno recombinante frente a amostras de soro de carneiros positivos (experimentalmente infectados) e

- negativos testadas à IDGA, isolamento bacteriano e PCR de amostras de urina;
- IV. Avaliar o ELISAi padronizado frente a amostras de soro de ovinos de campo negativos e positivos à IDGA para *B. ovis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes

O gene *hmg* (BOV\_A0512) para produção da proteína recombinante BoP59 (BoP59r) de *B. ovis* foi amplificado por PCR, usando os iniciadores senso (5' – CACCATGAATTTGGAAGACAGTGGTGC – 3') e o anti-senso (5' – TAGCTCAATGCCGTTGAAGGC – 3'), resultando em um fragmento de 1.808 pb. O produto de PCR foi clonado no vetor pTrcHis TOPO®, utilizando o pTrcHis TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, EUA), contendo cassete de resistência a ampicilina. Após a inserção do *hmg* no plasmídeo, este foi sequenciado para confirmação da inserção do gene de interesse de forma correta, quanto à localização e direção (Figura 2).

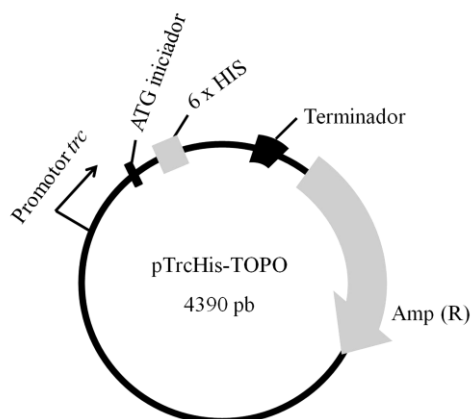


Figura 2. Plasmídeo de expressão pTrcHis-TOPO usado para expressão e produção de BoP59 recombinante. Amp (R): Cassete que confere resistência à ampicilina. 6 x HIS: sequência para expressão de seis histidinas.

A clonagem para produção da proteína recombinante BP26r foi feita utilizando-se o método de recombinação descrita por Davies e colaboradores (2005). Em resumo, o plasmídeo de clonagem pXT7 (contendo cassete de resistência a canamicina) foi linearizado através de dupla digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, e posterior amplificação por PCR para eliminar qualquer resíduo de vetor circular. Os iniciadores foram desenhados para a identificação de sequências específicas do gene *BMEI0536* localizado no cromossomo I de *B. melitensis* (número de acesso no GenBank AE008917.1), que apresenta 100% de homologia com o *bp26* de *B. ovis* (número de acesso no GenBank AAO39775.1), conforme descrito por Liang e colaboradores (2010). Esses iniciadores continham, além da sequência específica para o gene *BMEI0536*, 33 nucleotídeos de extensão complementares a extremidades geradas no vetor pXT7 após linearização (Figura 3). Uma recombinação homóloga ocorreu entre o produto de PCR e o vetor pXT7 em bactérias *Escherichia coli* BL21 quimicamente competentes. A BP26r gerada foi composta por 250 aminoácidos, com cauda de seis histidinas, e massa molecular igual a 26,56 kDa, segundo o programa disponível em: [www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).



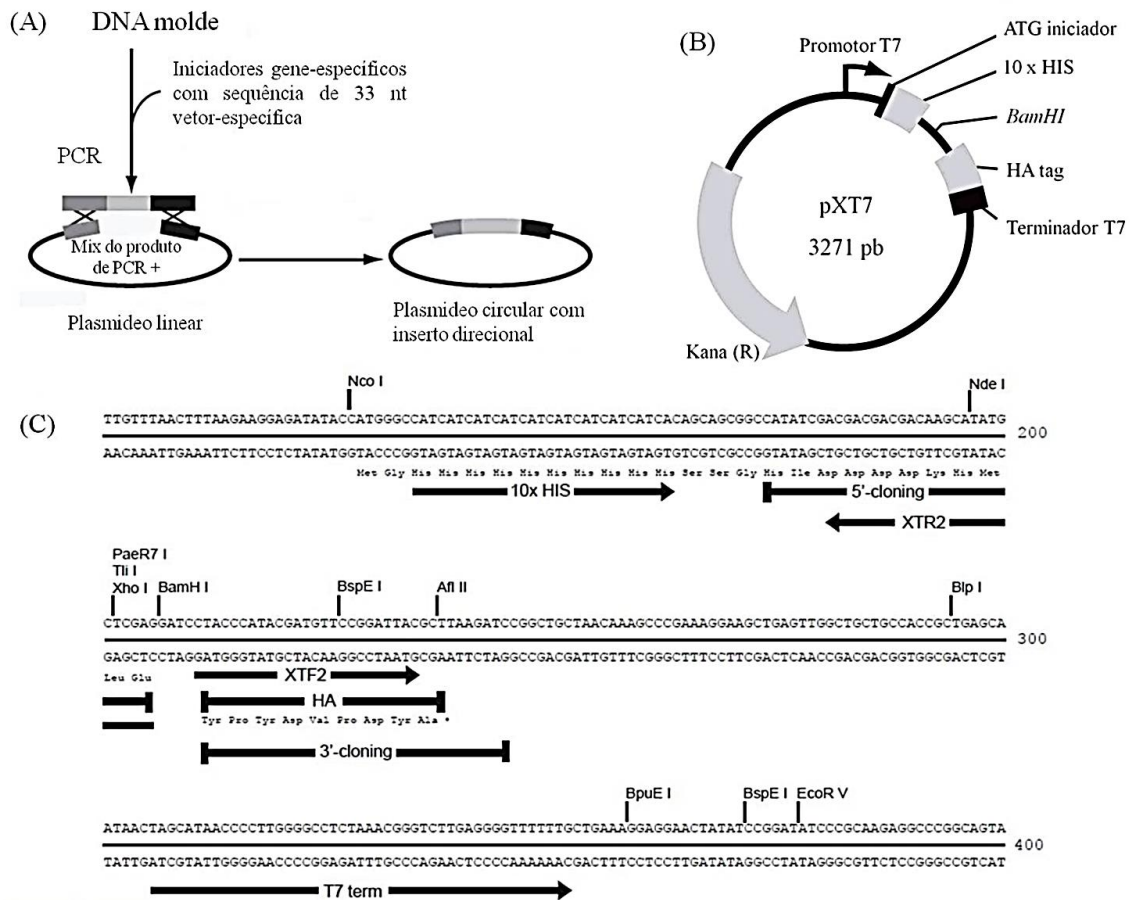


Figura 3. Metodologia de clonagem e expressão do *bp26*. (A) Clonagem do *bp26* a partir de recombinação homóloga do produto de PCR e plasmídeo linearizado. (B) Plasmídeo pXT7 usado para expressão e produção de BP26 recombinante. Kana (R): Cassete que confere resistência à canamicina para a *Escherichia coli* BL21. 10 x HIS: sequência para expressão de dez histidinas. (C) Localização do sítio de restrição da enzima *BamHI* utilizada para linearizar o plasmídeo e sequências do vetor contidas nos iniciadores (5'-cloning e 3'-cloning). Modificado de Davies e colaboradores (2005).

Para a produção da proteína recombinante VirB12 (VirB12r) de *B. ovis* foram utilizados os iniciadores senso ORF12K2-F (5' – ACCCGGGATATCGAAATTTTACGC – 3', contendo sítio de restrição da enzima *SmaI*) e o anti-senso ORF12K2-R (5' – AGCATATCCTGCGACATGC – 3'), conforme descrito por Sun e colaboradores (2005). Resumidamente, o produto de PCR foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO utilizando o TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, EUA), e posteriormente digerido com as enzimas *SmaI* e *PstI* para inserção no plasmídeo de expressão, pDS1 (Roche, EUA) (Figura 4). A VirB12r

purificada foi usada como controle positivo nos ensaios de *Western blot*, sendo composta por uma cauda de seis histidinas, apresentando uma massa molecular igual a 19,82 kDa, segundo o programa disponível em: [www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

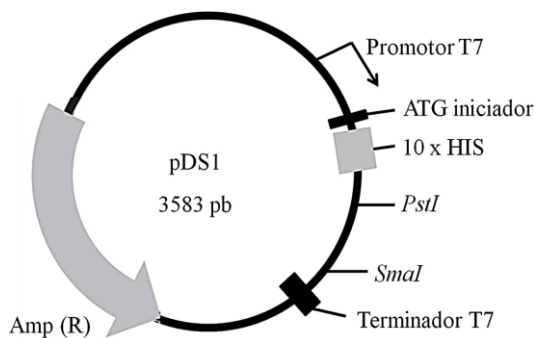


Figura 4. Plasmídeo de expressão, pDS1, usado para expressão e produção de VirB12 recombinante. Amp (R): Cassete que confere resistência à ampicilina para a *Escherichia coli* BL21. 10 x HIS: sequência para expressão de dez histidinas.

Após a construção dos três plasmídeos de expressão, as respectivas proteínas foram produzidas e foi realizado *Western blot* usando anticorpo anti-his para confirmar a expressão da proteína recombinante. O plasmídeo de expressão contendo o inserto foi introduzido em *Escherichia coli* BL21 eletrocompetente (Phoneutria, Brasil) através de eletroporação. Para isso, uma alíquota da suspensão de *E. coli* BL21 foi adicionada à solução contendo os plasmídeos com os insertos, na proporção de 6:1. O volume final foi transferido para uma cubeta estéril de 0,1 cm (BioRad, EUA) e submetida a um choque de 2,2 KV e 5,4 ms, utilizando o eletroporador da BioRad (BioRad, EUA). Posteriormente, 1 mL de caldo Lauria-Bertani (LB) contendo 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0, foi adicionado à suspensão contendo *E. coli* BL21 e plasmídeos com os insertos e transferido para um tubo de fundo cônico de 15 mL e mantido sob agitação (200 rpm) a 37°C por 1 hora. Após esse período, alíquotas de 100 e 900 µl dessa suspensão foram plaqueadas em ágar LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; 1,3% de ágar bacteriológico) contendo 50 mg/mL de X-Gal (5-bromo 4-cloro 3-indol β-D-galactopiranosídeo, Invitrogen, EUA), 100 mM de IPTG (isopropil β-D1 tiogalactopiranosídeo, Invitrogen, EUA) e 100 mg/mL de ampicilina (Phoneutria, Brasil) ou 100 µg /mL de canamicina (Gibco, EUA), dependendo do cassete de resistência a antibiótico que o plasmídeo possuía. O pXi tem cassete de

resistência a canamicina, enquanto pET101/D-TOPO e pSD1 possuem cassete de resistência à ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Unidades formadoras de colônias (UFC) que apresentaram coloração branca foram novamente plaqueadas, numeradas e testadas por PCR (Xavier et al., 2010) para verificar a presença do inserto.

Uma colônia de *E. coli* BL21 transformada contendo o plasmídeo para expressão da BoP59r, foi cultivada em LB contendo 100 mg/mL de ampicilina (Phoneutria, Brasil) e 1 mM glicose, sob agitação de 200 rpm a 37 °C, por 12 a 15 horas. Ao final desse período, duas alíquotas dessa cultura foram adicionadas a dois recipientes diferentes contendo LB na proporção de 1:10, 100 mg/mL ampicilina, iniciando assim duas novas culturas, induzida e não induzida. À cultura induzida foi adicionado IPTG (Invitrogen, EUA), na concentração final de 1 mM. À cultura não induzida foi adicionada glicose, na concentração final de 1 mM. Ambas as culturas foram incubadas sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 5 horas. Em seguida, alíquotas de 45 mL foram centrifugadas a 3.000 x g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado a -80°C, e posteriormente utilizado para purificação da BoP59r.

O mesmo procedimento foi utilizado para expressão de BP26r e VirB12r. Uma colônia de *E. coli* BL21 transformada, contendo o plasmídeo para expressão da BP26r, foi cultivada em caldo LB com canamicina (Gibco, EUA) na concentração final de 100 µg/mL, sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por 12 a 15 horas. Após esse período, uma alíquota dessa cultura foi adicionada ao meio LB, na proporção de 1:50, contendo 100 µg/mL de canamicina, sob agitação de 200 rpm, a 37°C, até que fosse obtida densidade óptica do meio entre 0,6 e 0,8, a 600 nm. Neste momento, IPTG (Invitrogen, EUA), na concentração final de 1 mM de IPTG, foi adicionada a cultura, denominada induzida, que foi cultivada por mais 4 horas, sob agitação de 200 rpm, a 37°C. A outra cultura (não induzida) foi cultivada também sob agitação de 200 rpm, a 37°C por 4 horas. Ao final desse período, ambas as culturas foram alíquotadas, centrifugadas a 3.000 x g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o

sedimento armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente submetido à purificação através de cromatografia de afinidade.

A purificação dos sedimentos contendo BoP59r, VirB12r e BP26r seguiu o mesmo protocolo. Inicialmente, o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 6,0 ml de solução de lise, pH 8,0 (20 mM Tris; 1 mM EDTA; 8M Uréia; 5 Mm Imidazol - Sigma-Aldrich, Brasil), contendo coquetel de inibidores de proteases específico para uso na purificação de proteínas com cauda de histidina (Sigma-Aldrich, Brasil), na proporção de 1:100, e homogeneizado. Em seguida, os extratos proteicos foram sonicados usando aparelho Vibra-Cell *Ultrasonic Processor* (Sonics e Materials, EUA), utilizando 10 pulsos de 30 segundos cada, com  $40^{\circ}$  de amplitude e intervalos de 1 minuto entre cada pulso. O extrato proteico foi então centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$ , a  $3.000 \times g$  por 30 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi passado pela coluna de cromatografia de afinidade, *GS (Glutathione Sepharose) Trap<sup>TM</sup> 4B columns* (GE Helthcare, EUA). Inicialmente, a coluna foi lavada com água ultrapura estéril e equilibrada com 5 mL da solução de lise (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 8 M Uréia, 5 Mm Imidazol, pH 8,0). Então, a amostra proteica foi aplicada à coluna e o fluxo liberado coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A coluna foi então lavada com solução de imidazol em concentrações crescentes (5 mM, 40 mM, 80 mM, 120 mM, 250 mM e 1 M) e uma alíquota de cada lavagem, nas diferentes concentrações de imidazol foi coletada e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise em SDS-PAGE. A quantificação de proteínas nas diferentes frações foi realizada usando o método de Bradford modificado (Neuhoff *et al.*, 1988).

### **3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE)**

O gel de separação foi preparado a 12% usando solução estoque de acrilamida 30% (29% de acrilamida - Invitrogen, EUA; 1% N,N-metileno-bis-acrilamida - Invitrogen, EUA), 1,5 M Tris-HCl (Invitrogen, EUA) pH 8,8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED (Invitrogen, EUA). O gel de concentração foi preparado a 4% usando

solução estoque de acrilamida 30%, 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e de TEMED (Invitrogen, EUA) (Neuhoff *et al.*, 1988).

Ao sedimento congelado, formado pela centrifugação de 1 mL de suspensão bacteriana, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (25% de solução a 0,5 M Tris-HCl - Invitrogen, EUA, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de beta-mercaptoetanol; 0,2% de azul de bromofenol; 4% de SDS), homogeneizado e mantido em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Foram utilizados 20  $\mu\text{g}$  de proteína diluída em tampão de amostra e 5  $\mu\text{L}$  de marcador de massa molecular para proteína (*broad range protein molecular weight markers*, Promega, EUA). A corrida eletroforética ocorreu em tampão Tris-glicina pH 8,0 (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0,1%) por 90 minutos a 110 volts. Posteriormente, o gel foi corado por solução de azul de coomassie, contendo 25% de metanol, 5% de ácido acético e 0,1% de azul brilhante de Coomassie G-250 (Bio-Rad, Brasil), para visualização das bandas.

### **3.3. Material biológico para diagnóstico da infecção por *Brucella ovis***

Para os ensaios de *Western blot*, utilizando BoP59r, BP26r e VirB12r como antígenos, foram utilizadas amostras de soro de quatro carneiros mestiços da raça Santa Inês de 12 meses de idade, sendo dois negativos e dois positivos para *B. ovis* no IDGA, isolamento bacteriano e PCR (Xavier *et al.*, 2010) de amostras de urina (Anexo 1).

Nos ensaios de ELISAI, utilizando BoP59r e BP26r como antígenos, para avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade, foram utilizadas amostras de soro de dois carneiros mestiços de Santa Inês de 12 meses de idade, sendo um negativo e outro positivo para *B. ovis* no IDGA, isolamento bacteriano e PCR (Xavier *et al.*, 2010) de amostras de urina (Anexo 1).

Os ensaios de ELISAI BP26r foram realizados testando 96 amostras de soro de carneiros mestiços de Santa Inês, de 12 meses de idade, experimentalmente infectados com 100  $\mu\text{L}$  de suspensão contendo  $1,2 \times 10^{10}$  UFC de *B. ovis* cepa ATCC25840 via intraconjuntival e com 2

mL de suspensão contendo  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL da mesma cepa por via intrapreputal. Destas amostras, foram utilizadas 41 negativas e 55 positivas simultaneamente à IDGA, isolamento bacteriano e PCR de amostras de urina (Anexo 2).

O ELISA padronizado com BP26r também foi testado utilizando 124 ovinos de campo, machos e fêmeas, sem informação sobre idade ou raça. Nesta etapa foram utilizadas 82 amostras de soro negativas e 42 amostras positivas à IDGA, considerada método padrão-ouro neste grupo de amostras (Anexo 3).

### 3.4. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para *Brucella ovis*

Os testes de IDGA foram realizados utilizando-se solução com 1,1% de agarose (Invitrogen, Brasil) em tampão borato 0,1 M, pH 8,6 aquecida e aplicada (4,6 mL) sobre uma lâmina de vidro de 25 por 75 mm, previamente limpa e desengordurada com solução de álcool-éter 50%. A seguir, o ágar foi perfurado com roseta de seis orifícios (4 mm de diâmetro cada e 3 mm equidistantes) e no orifício central foi aplicado o antígeno comercial composto por proteínas e lipopolissacarídeos solúveis extraídos de *B. ovis* amostra REO 198 (TECPAR, Brasil). Nos demais orifícios foram aplicados o controle positivo (TECPAR, Brasil) alternando com os soros a serem testados. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida a 25°C e a leitura foi realizada após 72 horas, em luz direta, sobre fundo escuro.

### 3.5. PCR específica para *Brucella ovis*

A extração de DNA de amostras de urina coletadas de carneiros foi realizada usando protocolo do fenol-clorofórmio, segundo Matrone e colaboradores (2009). Em resumo, foram adicionados 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris-HCL - Invitrogen, EUA, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0) a 1 mL de urina e centrifugados a 13.000 x g por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em tampão TE-2 (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl) e incubado a 80°C por 10 minutos. Foram então

adicionados 50 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen, Brasil) seguido de incubação a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de fenol (GE Healthcare, Brasil) e as amostras centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos. Então, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo de 1,5 mL e, a estes, adicionados 400 µL de fenol-clorofórmio (GE Healthcare, Brasil). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos, e 300 µL da fase aquosa foram transferidos para novo microtubo, e acrescidos de 300 µL de álcool isopropílico. As amostras foram mantidas a -20°C por 15 horas e, ao final deste período, centrifugadas a 13.000 x g por 30 minutos, para precipitação do DNA. O precipitado foi lavado através da adição de 1 mL de etanol a 70% e subsequente centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos. O precipitado formado foi ressuspensionado em 30 µL de tampão TE estéril e incubado a 56°C por 15 minutos, e depois mantido a -20°C até a realização da PCR.

A PCR para *B. ovis* foi realizada como descrito por Xavier e colaboradores (2010), utilizando os iniciadores para o ORF AO503, sendo a sequência  $5'$ -CCTACGCTGAACTTGCTTTTG-3', a sequência  $5'$ -ATCCCCCATCACCCATAACCGAAG-3' e o produto obtido de 228 pb. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µL, sendo 23 µL de solução comercial para PCR (Supermix, Invitrogen, Brasil), 0,5 µL de cada iniciador a 25 mM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 500 ng por reação do DNA extraído a ser testado. O controle positivo usado foi DNA extraído (por aquecimento) de uma colônia de *B. ovis* e o controle negativo foi água ultrapura estéril. Os parâmetros de amplificação usados foram 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e, por fim, uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 1%, em tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0) que foi corado com brometo de etídio e examinado em um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas foram comparadas com

o padrão de tamanho molecular e foram consideradas positivas aquelas amostras nas quais foi visualizado produto amplificado com tamanho molecular igual a 228 pb.

### **3.6. Isolamento bacteriano de amostras de urina de carneiro**

Aliquotas de 100 µL de urina foram plaqueadas em meio Thayer-Martin modificado, composto por meio GC, 1 % de hemoglobina bovina, suplemento antibiótico VCN (vancomicina, colistina e nistatina - BBL, EUA) e nitrofurantoína (Brown et al., 1971; Alton et al., 1975). As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e após 5 a 7 dias foi feita a leitura das placas. O isolamento bacteriano foi considerado negativo após 21 dias de incubação. As colônias com morfologia compatível com *B. ovis* foram submetidas a PCR específica segundo Xavier e colaboradores (2010).

### **3.7. Western blot com BoP59r, BP26r e VirB12r**

Aliquotas contendo 20 µg do lisado bruto de *B. ovis*, BoP59r, BP26r ou VirB12r purificadas, foram submetidas a SDS-PAGE. Em seguida, foi realizada a transferência eletroforética para membranas de PVDF com microporos de 45 µm (Immobilon®-P, Millipore, EUA), a 100 V por 1 hora, utilizando o sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad, EUA), imersas em tampão de transferência contendo 48 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 20% v/v de álcool metílico.

Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio [5% p/v de leite em pó desnatado dissolvido em TBS-Tween 0,1% (50 mM tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) e 0,1% v/v de Tween® 20 (Sigma Life Science, EUA) (TTBS)], por 1 hora, sob agitação, a 25°C. Em seguida, a membrana foi lavada com TTBS, por três vezes, e incubada com o soro a ser testado na diluição 1:100, diluído em uma solução de TTBS e com 2% de leite desnatado em pó, por 18 horas, sob agitação, a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada por três vezes com TTBS e incubada com o conjugado (IgG de coelho anti-ovino conjugado com peroxidase - Millipore, EUA), na diluição de 1:2000, por 1 hora, sob agitação, a 25°C. Outras três lavagens

com TTBS foram realizadas e em seguida foi usado o substrato DAB (3, 3'-diaminobenzidina - Millipore, Brasil), diluído conforme instruções do fabricante e aplicado sobre a membrana e incubada até o aparecimento de bandas, e no máximo por 15 minutos, quando a membrana foi lavada com água destilada.

### **3.8. Testes de repetibilidade e reprodutibilidade do ELISA indireto com BoP59r e BP26r**

O protocolo do ELISA indireto usando BoP59r ou BP26r como antígeno foi o mesmo, durante os testes de repetibilidade e reprodutibilidade. Placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, EUA) foram usadas para os ensaios de ELISAi. Duas concentrações das proteínas recombinantes purificadas foram testadas: 500 ng ou 1 µg de proteína por poço, diluídos em tampão carbonato - bicarbonato pH 9,6 contendo 0,015 M de carbonato de sódio, 0,035 M de bicarbonato de sódio. Assim, foram aplicados 100 µL por poço de BoP59r ou BP26r diluída e incubada a 4°C por 18 horas. Após essa incubação, a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de PBST (PBS com 0,05% de tween 20) por poço. Em seguida, foram aplicados 200 µL de PBST contendo 5% de leite em pó desnatado e a placa incubada por 1 hora a 25°C, seguida de duas lavagens com 200 µL de PBST. Após as lavagens, 100 µL dos soros a serem testados diluídos em PBSTL1% (PBST com 1% de leite em pó desnatado) foram aplicados e a placa incubada por 1 hora a 25°C.

O soro de um carneiro negativo à IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina e de um carneiro positivo nessas três provas foram testados em duplicata, nas diluições 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Ao final do período de incubação foram feitas três lavagens com PBST. Em seguida, 100 µL de IgG de coelho anti-ovino conjugado com peroxidase, na diluição 1:2000 em PBSTL1%, foram adicionados a placa incubada a 37°C por 1 hora. Três novas lavagens usando 200 µL de PBST foram realizadas. Ao final dessa etapa, foram aplicados 100 µL da solução contendo 0,5 mg/mL de OPD (*o*-Phenylenediamine) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5 (0,1 M ácido cítrico anidro, 0,2 M fosfato de sódio e peróxido de hidrogênio PA 130 volumes), seguido de

incubação por 10 minutos a 25°C. Após este período, a reação foi interrompida com 40 µL de ácido sulfúrico 4 M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA MR-96A Microplate Reader a 492 nm.

### 3.9. ELISAI com BP26r

O ponto de corte foi calculado pela soma entre o valor da média das repetições do controle negativo e duas vezes o valor do desvio padrão deste controle. Os resultados obtidos pelo ELISAI BP26r testando 96 amostras de ovinos, testados pelo IDGA, PCR e isolamento bacteriano e de 124 amostras de soro de ovinos, testadas por IDGA, foram tratados no *software*

STATA versão12, onde foi avaliada a acurácia global através do cálculo da área sob a curva ROC (*receiver operating characteristic*). Utilizando os valores mostrados na Tabela 3, foram calculados os valores de sensibilidade, que é a razão entre o número de verdadeiro positivo (VP) e a soma de VP ao falso negativo (FN), e de especificidade, calculada pela razão entre o número de verdadeiro negativo (VN) e a soma de VN e falso positivo (FP). Foram calculados ainda o valor preditivo positivo (VPP) pela razão entre o número de VP e a soma de VP e FP, e o valor preditivo negativo, através da divisão do número de VN pela soma de VN e FN (Florkowisk, 2008), conforme detalhado na Tabela 3.

Tabela 3: Metodologia para identificação de animais verdadeiro positivo (VP), falso negativo (FN), falso positivo (FP) e verdadeiro negativo (VN).

Resultado do ELISA	Considerando o IDGA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	Verdadeiro positivo	Falso positivo	VP + FP (VPP)
Negativo	Falso negativo	Verdadeiro negativo	VN + FN (VPN)
Total	VP + FN	FP + VN	

Modificado de Florkowisk, 2008.

A repetibilidade ou variabilidade intra-placa foi testada através da repetição de duas amostras, uma positiva e outra negativa, por seis vezes na mesma placa e ao mesmo tempo. A média e o coeficiente de variação (CV) foram calculados usando o programa Excel versão 2007 (Microsoft Corp, EUA). A reprodutibilidade ou variabilidade inter-placas foi determinada usando os resultados de duas amostras, uma positiva e outra negativa, repetidas 20 vezes, em placas distintas. As médias e os coeficientes de variação (CV) foram calculados usando o programa Excel versão 2007 (Microsoft Corp, EUA).

Durante a validação de um teste diagnóstico é importante utilizar um teste padrão reconhecido, que neste caso foi o IDGA ou a associação entre IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina. Com base nestes resultados, os ovinos foram classificados como negativos ou positivos. Foram classificados como verdadeiro positivo o ovino que apresentou resultado positivo nos dois testes (IDGA e ELISAI) para *B. ovis*; como falso negativo

aquele com resultado positivo no teste padrão e negativo no ELISAI; como falso positivo, o ovino negativo no teste padrão e positivo no ELISAI e como verdadeiro negativo, o ovino com resultado negativo nos dois testes (Tabela 3) (Florkowisk, 2008).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes

A indução da expressão e purificação da BoP59r (Figura 5), da BP26r (Figura 6) e da VirB12r (Figura 7) foram confirmadas por SDS-PAGE. No gel para avaliação da expressão da BP26, foi aplicada também uma alíquota de lisado bruto de *B. ovis* e de *E.coli* BL21 sem plasmídeo de expressão, para efeito de comparação entre os perfis proteicos (Figuras 6).

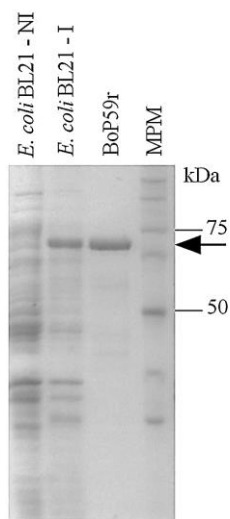


Figura 5. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de *Escherichia coli* BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de BoP59r; BoP59r purificada e marcador de massa molecular para proteínas. Seta: altura da BoP59r, proteína recombinante de 59 kDa.

No gel SDS-PAGE corado por azul de Coomassie (Figura 5) observa-se que na canaleta identificada como *E. coli* BL21-I o perfil proteico do cultivo induzido de *E. coli* BL21 apresenta maior quantidade da proteína com peso molecular de 59 kDa, correspondente à BoP59r, em comparação com o perfil da *E. coli* BL21 não induzida. Desta forma, pode-se afirmar que a produção de BoP59r foi eficientemente induzida em *E. coli* BL21 contendo plasmídeo de expressão com inserto para expressão dessa proteína recombinante cultivada em meio LB. Na canaleta identificada como BoP59r observa-se banda única, confirmando que esta foi eficientemente purificada por cromatografia de afinidade.

Na Figura 6, observa-se gel SDS-PAGE corado por azul de Coomassie. Na canaleta identificada como *B. ovis* observa-se o perfil proteico do lisado bruto bacteriano, na canaleta identificada como *E. coli* BL21 observa-se o perfil de proteínas de *E. coli* BL21 que não contém plasmídeo para expressão da BP26. Comparando-se o perfil da *E. coli* BL21 não induzida com a *E. coli* BL21 induzida, observa-se aumento da expressão de proteína com massa

molecular entre 25 e 35 kDa, proteína esta que apresenta mesma massa da BP26r purificada (26 kDa) presente como banda única na canaleta identificada como BP26r. Desta forma, pode-se afirmar que foi induzida a produção da BP26r por *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo para expressão dessa proteína e que BP26r foi purificada por cromatografia de afinidade.

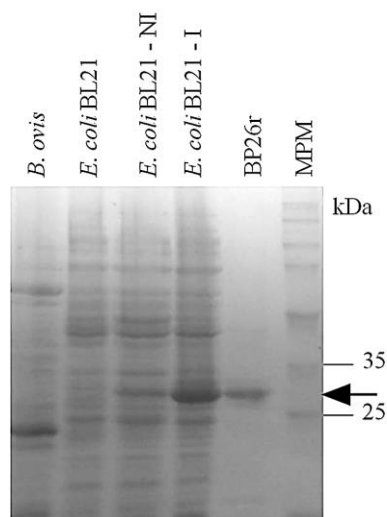


Figura 6. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de *Brucella ovis*, *Escherichia coli* BL21 sem plasmídeo de expressão, *Escherichia coli* BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de BP26r, BP26r purificada e marcador de peso molecular para proteínas. Seta: altura da BP26r, proteína recombinante de 26 kDa.

De forma semelhante ao observado nas Figuras 5 e 6, na Figura 7 observa-se que na canaleta identificada como *E. coli* BL21 induzida, o perfil proteico do cultivo induzido de *E. coli* BL21 apresenta maior quantidade da proteína com massa molecular de aproximadamente 19 kDa, correspondente à Virb12r, em comparação com o perfil da *E. coli* BL21 não induzida. Desta forma, pode-se afirmar que a produção de Virb12r foi eficientemente induzida. Na canaleta identificada como Virb12r observa-se banda única, confirmando que esta foi purificada.

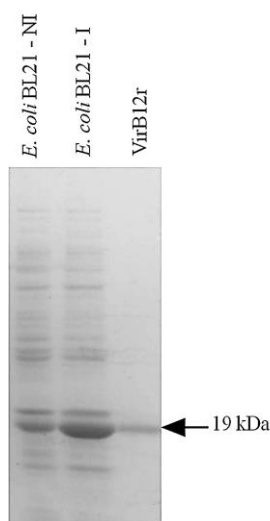


Figura 7. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, corado por azul de Coomassie. Perfil proteico de *Escherichia coli* BL21 não induzida (NI) e induzida (I) para expressão de VirB12r e VirB12r purificada. Seta: altura da VirB12r, proteína recombinante de 19 kDa.

#### 4.2. Western blot com BoP59r, BP26r e VirB12r

Na membrana submetida a *Western blot* e incubada com soro de carneiro negativo para *B. ovis*, pode-se observar apenas marcações extremamente fracas para as bandas de BoP59r e VirB12r, já na membrana incubada com soro de carneiro positivo, observam-se bandas fortemente marcadas nas canaletas contendo lisado bruto de *B. ovis* e VirB12r, BoP59r ou BP26r purificadas (Figura 8). Como mostrado por outros autores (Kittelberger e Reichel, 1998; Cerri et al., 2000), o *Western blot* é uma técnica sorológica sensível e específica no diagnóstico de infecção por *B. ovis*, podendo apresentar sensibilidade de 98,6% (Kittelberger e Reichel, 1998) e especificidade de 100% (Cerri et al., 2000), e no diagnóstico sorológico da infecção por *B. melitensis* em ovinos (Seco-Mediavilla et al., 2003) e humanos (Lindler et al., 1996) usando BP26 como antígeno. A proteína VirB12r é sabidamente antigênica e marcador sorológico da infecção por *Brucella* spp. (Rolán et al., 2008). Entretanto, esta foi a primeira vez

que a BoP59 e a VirB12 foram testadas como marcadores sorológicos da infecção por *B. ovis* em carneiros por *Western blot*.

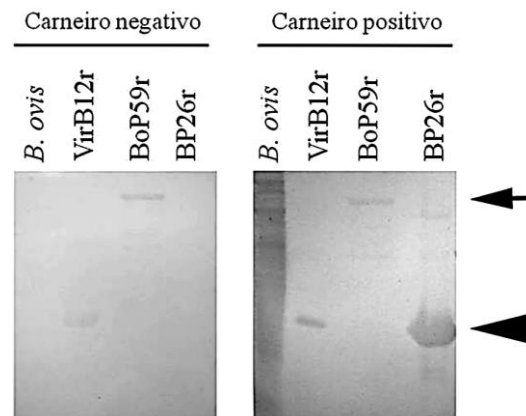


Figura 8. Membranas de PVDF submetidas a *Western blot*. Membranas incubadas com soros de carneiros negativo e positivo para *Brucella ovis*. Seta: altura da BoP59r e cabeça de seta: altura da BP26r e VirB12r.

A proteína BP26r mostrou-se consistentemente antigênica, e permitiu a diferenciação de animais infectados de não infectados, de forma semelhante ao que foi descrito por outros pesquisadores para *B. melitensis* (Lindler et al., 1996; Cloeckeaert et al., 2000; Yang et al., 2005; Liang et al., 2010) e *B. abortus* (Connolly et al., 2006).

#### 4.3. Teste de repetibilidade e reprodutibilidade do ELISA indireto com BoP59r e BP26r

Os resultados obtidos no teste de reprodutibilidade do ELISA usando 500 ng/poço e 1 µg/poço de BoP59r purificada, e oito diluições dos soros testados demonstraram que esta proteína recombinante não discriminou a amostra de soro de carneiro positivo da amostra do negativo (Figura 9). Desta forma, pode-se afirmar que a BoP59 não foi um bom marcador sorológico da infecção por *B. ovis* em carneiros.



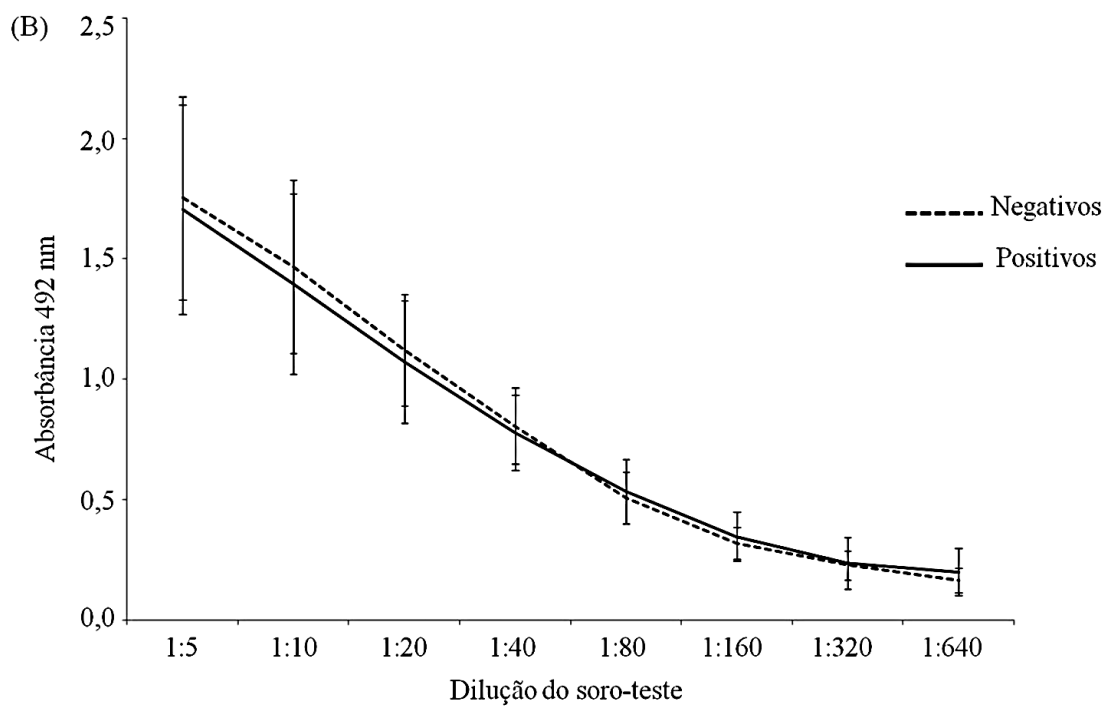
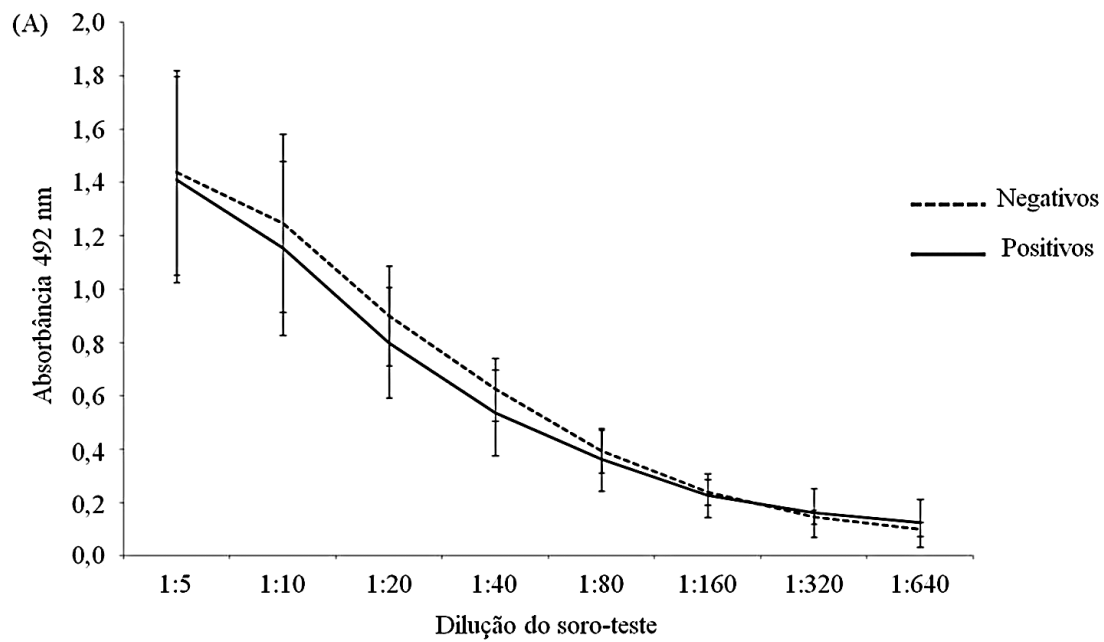


Figura 9. Teste de reprodutibilidade do ELISA<sub>i</sub> utilizando BoP59r purificada. A - 500ng de BoP59 purificada por poço. B - 1 µg de BoP59 purificada por poço. Foram realizadas 10 repetições dos soros em oito diluições, em duplicata, das amostras de soro de um carneiro positivo e um negativo. Não houve diferença estatística significativa entre amostras de carneiro infectado e não infectado.

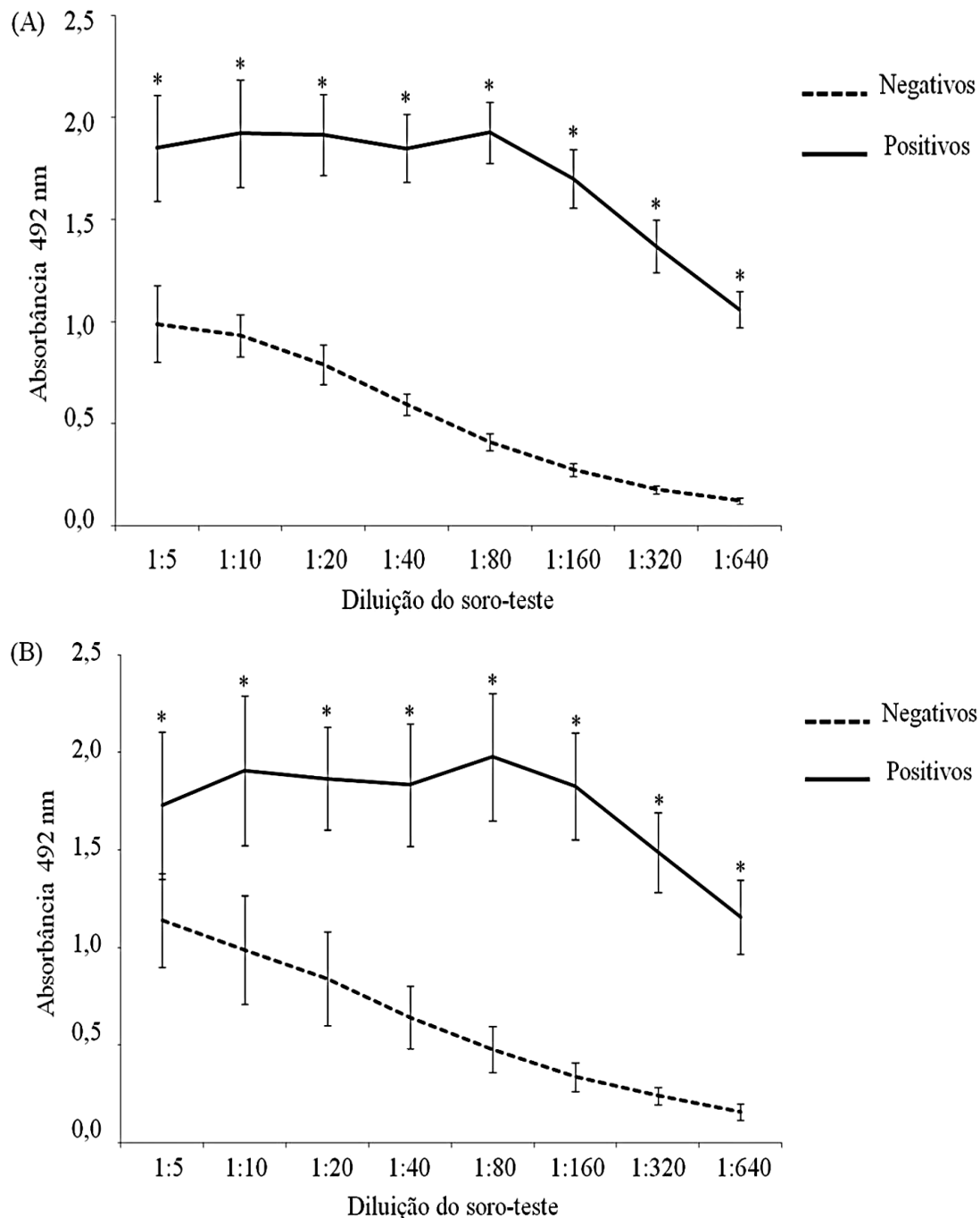


Figura 10. Teste de reprodutibilidade do ELISAI utilizando BP26r purificada. A - 500 ng de BP26r purificada por poço. B - 1 µg de BP26r purificada por poço. Foram realizadas 10 repetições dos soros em oito diluições, em duplicata, de um carneiro positivo (infectado) e um negativo (não infectado). Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. O valor das médias da amostra positiva foi superior e estatisticamente diferente das médias da amostra negativa, nas oito diluições ( $p < 0,05$ ).

O teste de reprodutibilidade do ELISAI utilizando BP26r demonstrou que essa proteína

recombinante foi eficiente em discriminar os soros de ovino positivo do negativo. Nesse

ensaio, foram usadas 500 ng/poço e 1 µg/poço de BP26r e oito diluições dos soros testados (Figura 10), sendo a melhor diferenciação observada utilizando-se 500 ng por poço.

Com base nestes resultados, 500 ng por poço foi a concentração de BP26r escolhida para ser utilizada no ELISAI para testar amostras de soro de ovinos positivos à IDGA e experimentalmente infectados. Assim, como nos ensaios de *Western blot*, também no ELISAI a BP26r mostrou-se antigênica e um bom

marcador sorológico de infecção por *B. ovis* ao reagir de forma distinta com soros de carneiros positivos e negativos. Os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação do teste de repetibilidade estão discriminados na Tabela 4. Os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação do teste de reprodutibilidade estão identificados na Tabela 5. Os valores de coeficiente de variação indicam que o ELISAI usando BP26r é um teste reprodutível.

Tabela 4: Valores de média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) obtidos no teste de repetibilidade do ELISAI usando BP26r como antígeno.

Quantidade de antígeno		Diluição do soro							
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
500 ng/ poço Positivo	Média	2,100	1,903	1,560	1,220	0,841	0,532	0,364	0,224
	DP	0,089	0,020	0,054	0,036	0,034	0,038	0,027	0,004
	CV	4,2%	4,2%	3,4%	2,4%	4,0%	7,2%	7,4%	1,8%
500 ng/ poço Negativo	Média	0,900	0,799	0,647	0,498	0,330	0,20	0,140	0,110
	DP	0,038	0,140	0,120	0,090	0,056	0,027	0,025	0,016
	CV	4,2%	17,5%	18,5%	18,1%	17,0%	13,5%	17,8%	14,5%

Tabela 5: Valores de média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) obtidos no teste de reprodutibilidade do ELISAI usando BP26r como antígeno.

Quantidade de BP26r		Diluição do soro							
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
500 ng/ poço Positivo	Média	1,85	1,923	1,915	1,849	1,927	1,7	1,369	1,059
	DP	0,259	0,263	0,199	0,167	0,149	0,142	0,127	0,087
	CV	14%	13,7%	10,1%	9,0	11,30%	9,73%	9,28%	8,21%
500 ng/ poço Negativo	Média	0,99	0,932	0,789	0,594	0,411	0,274	0,177	0,123
	DP	0,186	0,103	0,097	0,053	0,043	0,033	0,02	0,015
	CV	18,8%	11,1%	12,3%	8,90%	10,40%	12%	11,30%	12,20%
1µg/poço Positivo	Média	1,728	1,907	1,866	1,835	1,977	1,828	1,488	1,157
	DP	0,378	0,385	0,264	0,314	0,328	0,274	0,203	0,191
	CV	21,9%	20,2%	14,15%	17,1%	16,6%	15,0%	13,6%	16,5%
1µg/poço Negativo	Média	1,139	0,987	0,841	0,642	0,478	0,337	0,24	0,157
	DP	0,24	0,277	0,24	0,161	0,118	0,073	0,046	0,042
	CV	21,1%	28,1%	28,5%	25,1%	24,7%	21,7%	19,2%	26,8%

#### 4.4. ELISA indireto com BP26r

A discriminação entre amostras de soro negativas e positivas foi eficiente utilizando amostras de carneiros experimentalmente infectados (Figura 11). Os valores de sensibilidade para as diluições 1:20, 1:40 e 1:80

foram iguais a 100% e de especificidade iguais a 90,2%, 85,4% e 80,5%, respectivamente (Tabela 6) e de acurácia iguais a 1,0, 0,997 e 0,989 (Figura 12). A curva ROC é um gráfico de sensibilidade versus 1 - especificidade que permite a mensuração da acurácia global através do cálculo da área sob a curva, sendo

sensibilidade a fração de casos positivos corretamente identificados pelo teste, e especificidade a fração de casos negativos assim classificados pelo teste diagnóstico em questão. A curva ROC mostra graficamente o equilíbrio entre sensibilidade e especificidade (Florkowisk,

2008). Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia são os parâmetros usados na escolha da diluição a ser utilizada. São considerados bons os valores de acurácia superiores à 0,9, sendo o ideal valor igual a 1,0.

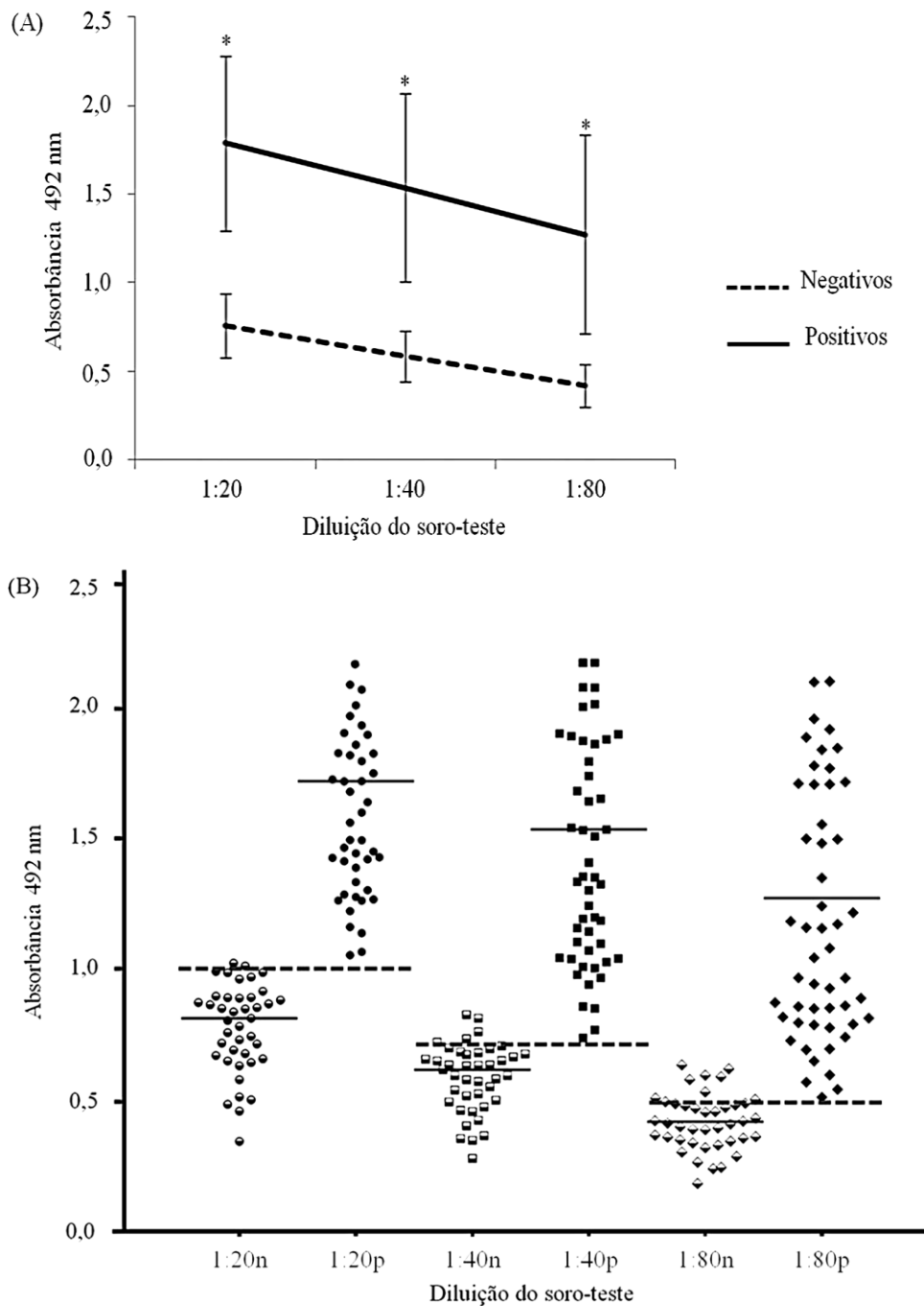


Figura 11. ELISAI BP26r para diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* em carneiros experimentalmente infectados. Foram testadas, em duplicata, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, 41 amostras de soro de carneiros negativos e 55 amostras de soro de carneiros positivos à IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina. (A) Foram utilizados 500ng de BP26r purificada por poço. Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. (\*) e (\*\*) Diferença estatística significativa com valor de  $P < 0,05$ . (B) Gráfico de dispersão dos valores de absorbância a 492 nm de amostras de soro de carneiros

submetidas ao ELISAi BP26r. A linha contínua representa a média e a linha pontilhada representa o ponto de corte para cada diluição.

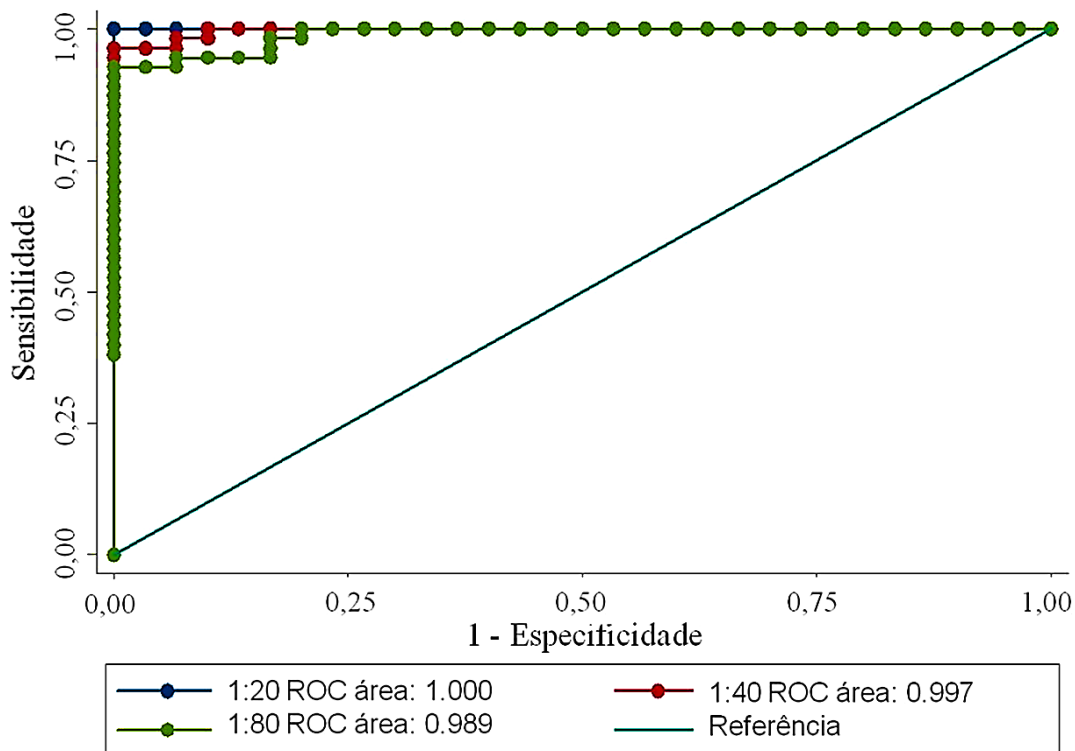


Figura 12. Curva ROC de resultados de ELISAi BP26r utilizando amostras de soro de carneiros negativos (n=41) e positivos (n=55) experimentalmente infectados com *B. ovis*, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, mostrando sensibilidade versus 1 menos especificidade.

Tabela 6: Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área abaixo da curva ROC do ELISAi BP26r de 55 amostras de carneiros experimentalmente infectados com *B. ovis* e 41 negativos à IDGA, PCR de urina e isolamento bacteriano, totalizando 96 amostras testadas.

Diluição do soro	ELISAi BP26r				
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia
1:20	100,0	90,2	93,2	100,0	1,000
1:40	100,0	85,4	90,2	100,0	0,997
1:80	100,0	80,5	87,3	100,0	0,989

Comparando os resultados do ELISAi BP26r testando amostras de soros de ovinos negativos e positivos somente à IDGA com os resultados obtidos com amostras de carneiros experimentalmente infectados e positivos simultaneamente à IDGA, PCR e isolamento

bacteriano de urina (Tabela 6), observa-se que os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia são maiores quando se usam os três testes em associação. O ELISAi BP26r foi eficiente em discriminar ovinos positivos de negativos à IDGA nas diluições 1:10, 1:20 e

1:40 (Figura 13), apresentando maiores valores de sensibilidade (85,7%), especificidade (85,4%) e acurácia (90,3%) na diluição do soroteste em 1:40. A sensibilidade do ELISAI BP26 usando soros de ovinos positivos somente à IDGA (85,7%) foi inferior ao valor obtido testando amostras de carneiros experimentalmente infectados (100%) e positivos à IDGA, PCR e ELISAI. Isso provavelmente ocorreu por que o IDGA apresenta sensibilidade variável durante o curso da infecção, com valores entre 50 e 88,8%

(Xavier et al., 2011) e carneiros que estejam eliminando *B. ovis* no semêem podem ser negativos à IDGA (Nozaki et al., 2011). Já os carneiros experimentalmente infectados foram considerados positivos se apresentassem resultado positivo em três testes diagnósticos: IDGA, PCR e isolamento bacteriano, simultaneamente, já que estudos demonstram que o uso combinado de dois ou dois ou três testes aumenta a certeza do diagnóstico (Hilbink et al., 1993; Estein et al., 2002).

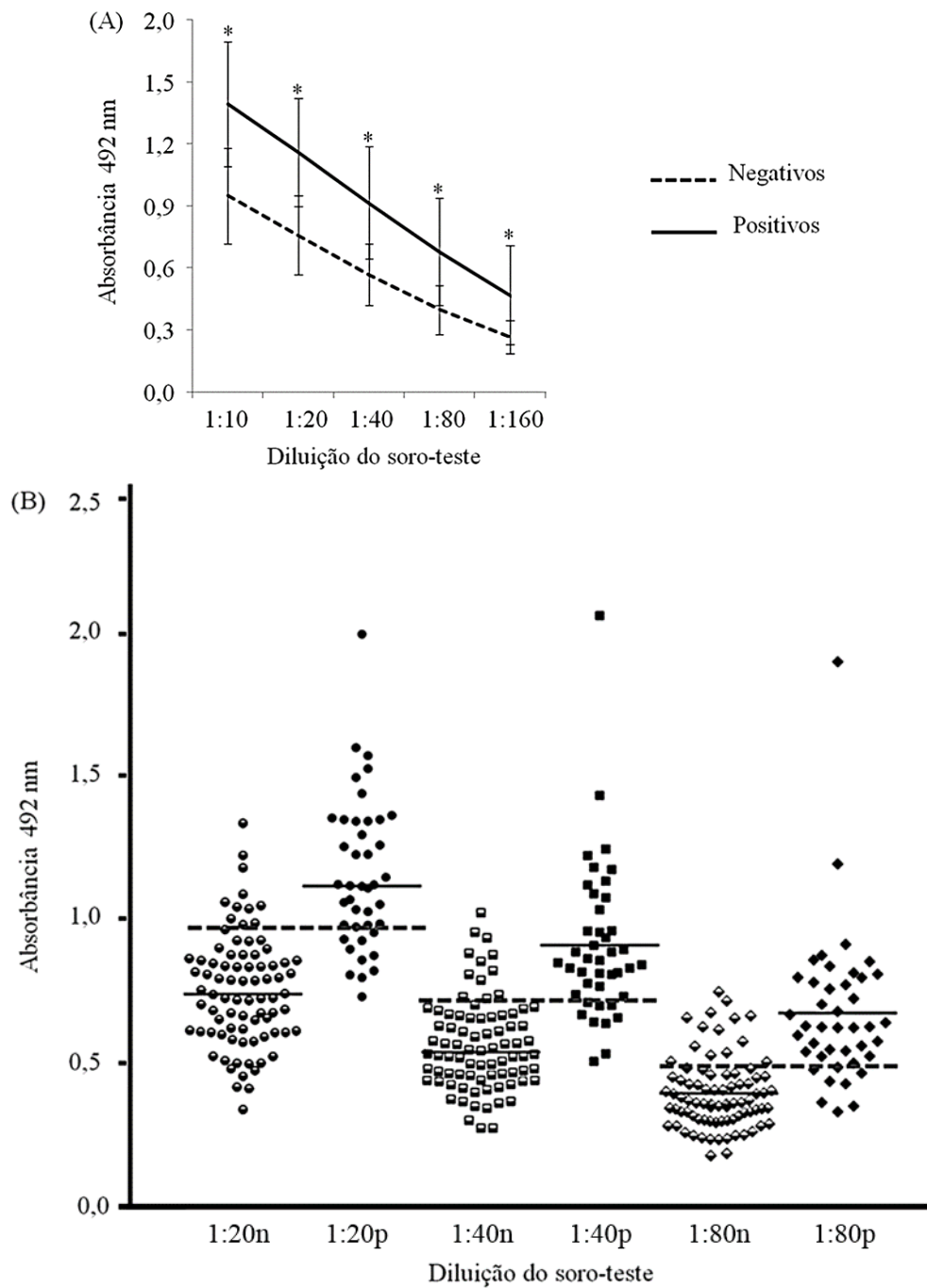


Figura 13. ELISAI BP26r para diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* utilizando 82 amostras de soro de ovinos negativos à IDGA e 42 amostras positivas à IDGA, em duplicata. (A) Foram utilizados 500 ng de BP26r purificada por poço, testando amostras de soro nas diluições 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Os pontos representam as médias das 10 repetições e o desvio padrão. (\*) e (\*\*) Diferença estatística significativa com valor de  $P < 0,05$ . (B) Gráfico de dispersão dos valores de absorbância a 492 nm de amostras de soro de ovinos submetidas à ELISAI BP26r nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80, A linha em preto contínua representa a média e a linha pontilhada em cinza representa o ponto de corte para cada diluição.



O ELISAI BP26r desenvolvido neste estudo apresentou sensibilidade de 100%, especificidade de 90,2% e área sob a curva ROC (AUC) igual a 1, utilizando amostras de soro (diluição 1:20) de carneiros experimentalmente infectados por *B. ovis* e positivos simultaneamente no IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina (Tabela 6). O ELISA BP26r desenvolvido por Zygmunt e colaboradores, utilizando BP26r purificada, apresentou sensibilidade de 81,8%. Já ao utilizar o ELISAI BP26r padronizado no presente trabalho para testar soros (diluição 1:40) de ovinos negativos e positivos à IDGA, a sensibilidade foi de 85,7%, especificidade de 85,4% e área sob a curva ROC igual a 0,903. Neste caso, os valores de sensibilidade, especificidade e AUC foram consideravelmente inferiores, em relação aos valores obtidos com as amostras definidas como positivas ao apresentarem simultaneamente resultados positivos para *B. ovis* à IDGA, PCR e isolamento bacteriano de urina. Nozaki e colaboradores (2011), utilizando animais experimentalmente infectados, observaram que a partir da 34ª semana pós-infecção todos os ovinos foram negativos à IDGA. Vale salientar que diversos autores demonstraram que o ELISAI é mais sensível que o IDGA (Cox et al., 1977; Worthington et al., 1984; Marin et al., 1989; Hilbink et al., 1993; Estein et al., 2002).

O primeiro ELISAI utilizando a BP26r como antígeno (200 ng por poço) foi desenvolvido para diagnóstico da infecção por *B. melitensis* em ovinos e apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 93% em amostras de soros positivos (diluição 1:50) a FC e isolamento bacteriano (Cloeckaert et al., 2001). Jacques e colaboradores (2007) desenvolveram um ELISAI com a BP26r como antígeno (200 ng por poço) capaz de diferenciar soro (diluição 1:50) de ovinos infectados com *B. melitensis* de ovinos vacinados com Rev 1, com especificidade de 100%. Gupta e colaboradores (2010) padronizaram um ELISAI usando BP26r como antígeno (1 µg por poço) para diagnóstico da infecção por *B. melitensis* em soro (diluição 1:100) de caprinos, e este teste apresentou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 90%. O ELISAI desenvolvido neste trabalho é o primeiro a utilizar a BP26r como antígeno em ELISAI para diagnóstico da infecção por *B. ovis* em carneiros experimentalmente infectados,

além disso, alia altos valores de sensibilidade (100%), especificidade (90,2) e acurácia global, que foi igual a 1,0 sendo este o maior valor possível para um teste diagnóstico.

## 5. CONCLUSÕES

A proteína BoP59r não foi eficiente, pelo *Western blot* e ELISAI, em discriminar carneiro infectado de carneiro não infectado por *B. ovis*.

A proteína BP26r é antigênica para ovinos infectados por *B. ovis* por *Western blot* e ELISAI. O ELISAI usando como antígeno a BP26r é eficiente em diferenciar ovinos infectados de ovinos não infectados por *B. ovis* com sensibilidade de 100%, especificidade de 90,2% e acurácia igual a 1,0. O teste foi eficiente em detectar ovinos com infecção crônica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, M.; TENDERDY, R. P.; SQUIRE, P. G. et al. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.20, n.6, p.1159-1164, 1984.
- ALTON, G. G., JONES, L. M. & PIETZ, D. E. (1975). Laboratory Techniques in Brucellosis. WHO Monograph Series n.55. Geneva, Switzerland: WHO.
- ALVES, C.J.; FIGUEIREDO, S.M.; AZEVEDO, S.S. et al. Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast Region of Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.41, p.365-367, 2010.
- ANTUNES, J. M.; ALLENDORF, S. D.; APPOLINÁRIO, C. M., et al. Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro- and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. *Vet. Microbiol.*, v.161, n.3-4, p.339-343, 2013.
- AVILA-CALDERÓN, E.D.; LOPEZ-MERINO, A.; JAIN, N. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.*, v.2012, ID 352493, 2012.
- AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; ALVES, F. A. L. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte,

- Brasil. *Agropecuária Técnica*, v.25, n.2, p.45-50, 2004.
- BATISTA, H. M. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Ocorrência de ovinos soropositivos para *Brucella ovis* nos rebanhos do estado do Ceará. In: Encontro de pesquisa e pós-graduação da Universidade Estadual Vale do Acaraú (Anais...), Sobral, 2011.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H. et al. Epididymitis in Rams. Studies on Pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, p.27-41, 1964.
- BLOBEL, H.; FERNANDES, J. C. T.; MIES FILHO, A. et al. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.7, p.1-4, 1972.
- BOSCHIROLI, M.L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V. et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.341-348, 2002.
- BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.435-446, 2002.
- BRICKER, B.J., EWALT, D.R., Evaluation of the HOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol.*, v.5, n.37, 2005.
- BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, v.3, n.15, 2003.
- BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.1640-1642, 1994.
- 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, n.10, p.293-296, 1985.
- BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg.*, v.54, p.351-364, 1956.
- BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.
- BURGESS, G. W.; SPENCER, T. L.; NORRIS, M. J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.62, n.8, p.262-264, 1985.
- CARO-HERNÁNDEZ, P.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; MIGUEL, M. et al. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.*, v.75, n.8, p.4050-4061, 2007.
- CARPENTER, T. E.; BERRY, S. L.; GLENN, J. S. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: epidemiologic simulation model. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, n.8, p.977-982, 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, n.3, p.160-167, 2010.
- CERRI, D.; AMBROGI, C.; EBANI, V. V. et al. Experimental *Brucella ovis* infection in mouflon (*Ovis musimon*). *J. Wildlife Dis.*, v.38, n.2, p.287-290, 2002.
- CERRI, D.; EBANI, V. V.; PEDRINI, A. et al. Evaluation of tests employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. *New Microbiol.*, v.23, n.3, p.281-288, 2000.
- CHAIN, P. S.; COMERCI, D. J.; TOLMASKY, M. E. et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect. Immun.*, v.73, p.8353-8361, 2005.
- CHAVES, D. P.; CAVALCANTE, A. C. L.; BATISTA, Z. S. et al. Detecção de anticorpos anti-*Brucella ovis* no estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, Anais... 2002.
- CHIEBAO, D. P.; THOMAZELLA, P. Epididimite ovina: análise da situação no município de Piedade, São Paulo. *Pesq. Tecnol.*, v.8, n.16, 2011.
- CHIN, J. C. Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. *Aust. Vet. J.*, v.60, n.9, p.261-267, 1983.
- CHIN, J.C.; PANG-TURNER, B. Profiles of serological reactivity against cytosoluble antigens of *Brucella ovis* in experimentally

- infected rams. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.12, p.2647-2652, 1990.
- CHIN, J.; TURNER, B. Extraction of membrane antigens from *Brucella ovis* and an assessment of their serological activity by immunoblotting. *J. Gen. Microbiol.*, v.136, p.1615-1622, 1990.
- CHO, H. J.; NILO, L. Diagnostic sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in ram. *Can. J. Vet. Res.*, v.51, p.99-103, 1987.
- 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.
- 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 deslançados no semi-árido do Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.137-143, 2007.
- CLOECKAERT, A.; BAUCHERON, S.; VIZCAÍNO, N. *et al.* Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.8, n.4, p.772-775, 2001.
- CLOECKAERT, A.; DEBBARTH, H.S.A.; VIZCAÍNO, N. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.140, p.139-144, 1996.
- CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O. An IS711 element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.7, n.5, p.835-839, 2000.
- CLOECKAERT, A.; JACQUES, I.; GRILLÓ, M. J. *et al.* Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, v.22, p.2827-2835, 2004.
- CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M. *et al.* Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiol.*, v.141, p.2111-2121, 1995.
- COLETO, Z. F.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. *et al.* Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p.551-552, 2003.
- CONNOLLY, J.P.; COMERCI, D.; ALEFANTIS, T.G. *et al.* Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*, v.6, p.3767-3780, 2006.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, n.2, p.213-221, 1997.
- COSTA, E.A.; SANT'ANNA, 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, n.3, p.751-754, 2012.
- COSTA, L. F.; NOZAKI, C. N.; LIRA, N. S. C. *et al.* Species-specific nested PCR as a diagnostic tool for *Brucella ovis* infection in rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, no prelo, 2013.
- COX, J.C.; GORRIE, C.J.R.; NAIRN, R.C. *et al.* A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Brit. Vet. J.*, v.133, p.442-445, 1977.
- CUBA-CAPARÒ, A.; MYERS, D. M. Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. *Am. J. Vet. Res.*, v.34, n.8, p.1077-1085, 1973.
- CUNHA FILHO, L. F. C.; LEUZZI JUNIOR, L. A.; SILVA, L. C. *et al.* Ocorrência de ovinos reagentes à prova de imunodifusão em gel de ágar, para *Brucella ovis*, em propriedades da região norte do Paraná. *UNOPAR Cient.*, v.9, n.1, p.67-70, 2007.
- DAVIES, D. H.; LIANG, X.; HERNANDEZ, J. *et al.* Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: High-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, n.3, p.547-552, 2005.
- DEBBARH, H.S.A.; CLOECKAERT, A.; BÉZARD, GUY. *Et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis* infected and *B. melitensis* Rev.1-vaccinated sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.3, n.3, p.305-308, 1996.
- DELVECCHIO, V. G., KAPATRAL, V.; REDKAR, R. J. *et al.* The genome sequence of

- the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.99, p.443-448, 2002.
- EISENBERG, T.; HAMANN, H. P.; KAIM, U. et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, n.10, p.3753-3755, 2012.
- ESTEIN, S.M.; BALDI, P.C.; BOWDEN, R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.14, p.407-411, 2002.
- FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J.M. et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rum. Res.*, v.29, p.13-19, 1998.
- FLORKOWISK, C. M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: Communicating the performance of diagnostic tests. *Clin. Biochem. Rev.*, v.29, p.83-87, 2008.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.57, p.2688-2693, 2007.
- FOSTER, R. A.; LADDS, P. W.; BRIGGS, G. D. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.8, p.262-264, 1987.
- GALINDO, R.C.; MUÑOZ, P.M.; MIGUEL, M.J. et al. Differential expression of inflammatory and immune response genes in rams experimentally infected with a rough virulent strain of *Brucella suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.127, p.295-303, 2009.
- GALL, D.; NIELSEN, K.; VIGLIOCCO, A. et al. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rumin. Res.*, v.48, p.173-179, 2003.
- GAMAZO, C.; WINTER, A. J.; MORIYÓN, I. et al. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.57, n.5, p.1419-1426, 1989.
- GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281-297, 2002.
- GRILLÓ, M. J.; MARÍN, C. M.; BARBERÁN, M. et al. Efficacy of *bp26* and *bp26/omp31* *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, v.27, p.187-191, 2009.
- GUPTA, V. K.; KUMARI, R.; VOHRA, J. et al. Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goats. *Small Rumin. Res.*, v.93, p.119-125, 2010.
- GUPTA, V.K.; RADHAKRISHNAN, G.; HARMS, J. Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B. melitensis*. *Vaccine*, v.30, n.27, 4017-4022, 2012.
- HALLANDER, H. O. Microbiological and serological diagnosis of *pertussis*. *Clin. Infect. Dis.*, v.28, Suppl. 2, S99-106, 1999.
- HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.*, v.187, p.2715-2726, 2005.
- HARTLEY, W.J.; JEBSON, J.L.; MCFARLANE, D. Some observations on natural transmission of ovine brucellosis. *N. Z. Vet. J.*, v.3, p.5-10, 1955.
- HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double immune gel diffusion test and the enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.*, v.41, p.111-115, 1993.
- JACOBS, E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. *Clin. Infect. Dis.*, v.17, Suppl. 1, S79-82, 1993.
- JACQUES, I.; VERGER, M.; LAROUCAU, K. et al. Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by *bp26* and *omp31* *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine*, v.25, p.794-805, 2007.
- JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; MARÍN, C. M.; BARBERÁN, M. Et al. Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*, *Vaccine*, v.11, n.1, p.61-66, 1993.
- JONES, L.M.; DUBRAY, G.; MARLY, J. Comparison of methods of diagnosis of

- Brucella ovis* infection of ram. *Ann. Rech. Vet.*, v.6, n.1, p.11-22, 1975.
- JULIANO, R. S.; SILVA, M.S.P.; PELLEGRIN, A.O. et al. Prevalência de brucelose ovina no município de Corumbá-MS. *Vet. Zootec.*, v.18, n.4, supl. 3, p.827-830, 2011.
- KANG, S.I.; HER, M.; KIM, J.W. et al. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.77, n.18, p.6726-6728, 2011.
- KATZ, J. M.; HANCOCK, K.; XU, X. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v.9, n.6, p.669-683, 2011.
- KITTELBERGER, R.; HILBINK, F.; HANSEN, M. F. et al. Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, p.210-218, 1995.
- KITTELBERGER, R.; REICHEL, M.P. Evaluation of electrophoretic immunoblotting for *Brucella ovis* infection in deer using ram and deer serum. *N. Z. Vet. J.*, v.46, p.32-34, 1998.
- KOVÁČOVÁ, D.; ZUBRICKÝ, P.; BABINČÁKOVÁ, M. et al. Importance of serological diagnostics in ovine epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v.51, p.219-224, 2007.
- LEE, K.; CARGILL, C.; ATKINSON, H. Evaluation of an enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.62, n.3, p.91-93, 1985.
- LETESSON, J.J.; TIBOR, A.; EYNDE, G. et al. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goat to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.4, n.5, p.556-564, 1997.
- LIANG, L.; LENG, D.; BURK, C. Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens. *Plos Negl. Trop. Dis.*, v.4, n.5, e673, 2010.
- LIBAL, M. C.; KIRKBRIDE, C. A. *Brucella ovis* – induced abortion in ewes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, n.5, p.553-554, 1983.
- LIMA, A. M. C.; ALVES, S. M.; FARIAS, D. A. et al. Diagnóstico sorológico de *Brucella ovis* em ovinos do estado da Paraíba. In: VII Congresso nordestino de produção animal. Anais ... 2012.
- LINDLER, L.E.; HADFIELD, T.L.; TALL, B.D. et al. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.*, v.64, n.7, p.2490-2499, 1996.
- LÓPEZ, G.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M. et al. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. *Vet. Microbiol.*, v.116, p.232-238, 2006.
- LUDFORD, C.G. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.313-317, 1972.
- 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-GARCÉS, 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.; BAGUES, M.P.J.; BLASCO, J.M. 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 soropidemiológica da infecção por vírus Maedi-visna e *Brucella ovis* em ovinos do estado de Minas Gerais. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTÍN-MARTIN, A.I.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; SANCHO, P. et al. Analysis of the occurrence and distribution of Omp25 / Omp31 family of surface proteins in six classical *Brucella* species. *Vet. Microbiol.*, v.137, p.74-82, 2009.
- 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.
- MCGIVEN, J. A.; NICOLA, A.; COMMANDER, N. J. et al. An evaluation of the capability of existing and novel serodiagnostic methods for porcine brucellosis

- to reduce false positive serological reactions. *Vet. Microbiol.*, v.160, n.3-4, p.378-386, 2012.
- MOL, J. P. S.; FRANÇA, S. A.; PAIXÃO, T. A. et al. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *R. Bras. Ci. Vet.*, v.19, n.3, p.117-126, 2012.
- MOLELLO, J.A.; JENSEN, R.; FLINT, J.C. Placental pathology. I. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.24, p.897-904, 1963.
- MONREAL, D.; GRILLÓ, M. J.; GONZÁLEZ, D. et al. Characterization of *Brucella abortus* o-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect. Immun.*, v.71, n.6, p.3261-3271, 2003.
- MORAND-FEHR, P.; BOYAZOGLU, J. Present state and future outlook of the small ruminant sector. *Small Rum. Res.*, v.34, p.175-188, 1999.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.209-227, 2002.
- MYERS, D.M. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Applied Microbiol.*, v.26, n. 6, p. 855-857, 1973.
- MYERS, D.M.; JONES, L.M.; VARELA-DIAZ, V.M. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Applied Microbiol.*, v.23, p. 894-902, 1972.
- MYERS, D.M.; SINIUK, A. A. Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Applied Microbiol.*, v.19, n.2, p. 335-337, 1970.
- NÁREZ, G.M.; APARICIO, E.D.; ÁLVAREZ, J.F.M. et al. Epididymitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico. *Vet México*, v.30, n.4, p. 329-336, 1999.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, p.255-262, 1988.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.447-459, 2002.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.L. et al. Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by Indirect Enzyme Immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.*, v.28, p.243-250, 2007.
- NILO, L.; MACDONALD, D.W.; GODKIN, G.F. et al. Ovine brucellosis in Alberta. *Can. Vet. J.*, v.27, p.245-249, 1986.
- NOZAKI, C. N.; LIRA, N. S. C.; AUGUSTO FILHO, O. et al. Rapid serum agglutination and agar gel immunodiffusion tests associated to clinical signs in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Ciência Rural*, v.41, n.8, p.1441-1446, 2011.
- NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C. 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, n.1, p.1-5, 2004.
- NÚÑEZ-TORRES, E. D.; DÍAZ-APARICIO, E.; HERNÁNDEZ-ANDRADE, L. et al. Sensitivity and specificity of an ELISA as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v.39, n.3-4, p.123-128, 1997.
- NÚÑEZ-TORRES, E.; DÍAZ-APARICIO, E.; TENORIO, V.R. et al. Stability of antigen and agarose used in a Double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, p.113-115, 1998.
- OSBURN, B. I. The relation of fetal age to the character of lesions in fetal lambs infected with *Brucella ovis*. *Path. Vet.*, v.5, p.395-406, 1968.
- OSBURN, B. I.; KENNEDY, P. C. Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Path. Vet.*, v.3, p.110-136, 1966.
- PAULSEN, I. T.; SESHADRI, R.; NELSON, K. E. et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.99, p.13148-13153, 2002.
- PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A. et al. Ocorrência de ovinos sororeagentes para *Brucella ovis* no Estado de Alagoas, Brasil. *Vet. Zootec.*, v.16, n.3, p.500-508, 2009.
- PLANT, J.W.; EAMENS, G. J.; SEAMAN, J. T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.
- PRAUD, A.; CHAMPION, J. L.; CORDE, Y. et al. Assessment of the diagnostic sensitivity and

- specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet. Res.*, v. 8, n. 68, p. 1-7, 2012.
- QIU, J.; WANG, W.; WU, J. et al. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of *Brucella melitensis* reacting with murine monoclonal and sheep antibodies. *Plos One*, v.7, n.3, e34246, 2012.
- RAHALEY, R. S.; DENNIS, S.M.; SMELTZER, M.S. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. *Vet. Rec.*, v.113, p.467-470, 1983.
- RAMOS, A. A.; MIES, A.; SCHENCK, J. A. P. et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.1, p.211-213, 1966.
- RIDLER, A. *Brucella ovis* infection in deer. *Surveillance*, v.28, n.3, p.6-8, 2001.
- RIDLER, A. L.; WEST, D. M. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. *N. Z. Vet. J.*, v.50, n.1, p.19-22, 2002.
- RIEZU-BOJ, J. I.; MORIYON, I.; BLASCO, J. M. et al. Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.23, n.5, p.938-942, 1986.
- RIS, D. R.; HAMEL, K. L.; LONG, D. L. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet. J.*, v.32, p.18-20, 1984.
- 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 I, 2009.
- ROBLES, C. *Brucelosis em carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27 p.
- ROBLES, C.A.; UZAL, F.A.; OLAECHEA, F.V. Epidemiological observations in a corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Vet. Res. Commun.*, v.22, p.435-443, 1998.
- ROLÁN, H.G.; DEN HARTIGH, A.B.; KAHL-MCDONAGH, M. et al. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.15, n.2, p.208-214, 2008.
- ROSSETTI, O.L.; ARESE, A.I.; BOSCHIROLI, M.L. et al. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, n.1, p.165-169, 1996.
- SANTIAGO, L. B.; FERNANDES, F. S. A.; PINHEIRO, R. R. Lentivirose de pequenos ruminantes e brucelose ovina no Brasil. Embrapa: Nota técnica Caprinos e Ovinos, 2012.
- SANTOS, R.L., POESTER, F.P., LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.42-56, 2005.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R. et al. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates first report. *J. Med. Primatol.*, v. 38, n.1, p.70-73, 2009.
- SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, p.375-382, 2008.
- SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; CÖLLNER, C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.60, p. 801-808, 2010.
- SEARSON, J. E. Distribution of *Brucella ovis* in the tissues of rams reacting in a complement fixation test for ovine brucellosis. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.1, p.30-31, 1986.
- SEARSON, J. E. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.58, p.5-7, 1982.
- SEARSON, J. E. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.4, p.108-109, 1987.
- SECO-MEDIAVILLA, P.; VERGER, J.M.; GRAYON, M. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.10, n.4, p.647-651, 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, n.4, p.852-859, 2009.

- 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. *Ciênc. Anim.*, v.13, n.1, p.51-54, 2003.
- 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. *Infect. Immun.*, v.79, n.4, p.1706-1717, 2011.
- SIMPLÍCIO, A. A. Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. *Rev. CFMV*, Ano XVII, n.52, p.27-36, 2011.
- SOUZA, T. S.; COSTA, J.N.; MARTINEZ, P.M. et al. Inquérito soro-epidemiológico de *Brucella ovis* em rebanhos ovinos no semiárido baiano. *Vet. Zootec.*, v.18, n.4, supl. 3, p.697-700, 2011.
- SPENCER, T.L.; BURGESS, G.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Res. Vet. Sci.*, v.36, p.194-198, 1984.
- SPICIC, S.; ZDELAR-TUK, M.; RACIC, I. et al. Serological, bacteriological, and molecular diagnosis of brucellosis in domestic animals in Croatia. *Croat. Med. J.*, v.51, n.4, p.320-326, 2010.
- SUN, Y.H.; ROLAN, R.G.; HARTIGEN, A.B. et al. *Brucella abortus* VirB12 is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. *Infect. Immun.*, v.73, n.9, p.6048-6054, 2005.
- TIWARI, A.K.; KUMAR, S.; PAL, V. et al. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis. *Clin. Vacc. Immunol.*, v.18, n.10, p.1760-1764, 2011.
- TSOLIS, R. M. Comparative genome analysis of the  $\alpha$ -proteobacteria: Relationship between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.99, p.12503-12505, 2002.
- TSOLIS, R. M., SECHADRI, R., SANTOS, R.L. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One*, v.4, p.1-9, e5519, 2009.
- VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.35, n.3, p.292-295, 1985.
- VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na metade sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Anim.*, v.39, n.4, p.1187-1192, 2009.
- VIGLIOCCO, A.M., PAULO, P.S.S., MESTRE, J. Development and validation of the indirect enzyme immunoassay for the detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.357-368, 1997.
- VIZCAINO, N.; KITTELBERGER, R.; CLOECKAERT, A. et al. Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect. Immun.*, v.69, n.11, p.7020-7028, 2001.
- VIZCAÍNO, N.; VERGER, J. M.; GRAYON, M. et al. DNA polymorphism at the *omp31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiol.*, v.143, p.2913-2921, 1997.
- WALKER, R.L.; LEAMASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.188, n.4, p.393-396, 1986.
- WATTAM, A. R.; INZANA, T.; WILLIAMS, K. P. et al. Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *mBio*, v.3, n.5, e00246, 2012.
- WEBB, R.F.; QUIN, 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.
- WINCHELL, J.M.; WOLFF, B.J.; TILLER, R. et al. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.3, p.697-702, 2010.
- WORTHINGTON, R. W.; STEVENSON, B. J.; 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 *B. ovis* infection in ram. *N. Z. Vet. J.*, v.32, p.58-60, 1984.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A. et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p.2252-2260, 2009.

XAVIER, M.N.; SANT'ANNA, F.M.; SILVA, T.M.A. et al. A comparison of two agar gel immunodiffusion methods and a complement fixation test for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.4, 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 the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.

YANG, X.; HUDSON, M.; WALTERS, N. et al. Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. *Infect. Immun.*, v.73, n.11, p.7297-7303, 2005.

ZYGMUNT, M. S.; BAUCHERON, S.; VIZCAINO, N. et al., Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.87, p.213-220, 2002.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Amostras de carneiros testadas em ensaios de *Western blot*

Teste realizado	Carneiros			
	Negativos		Positivos	
	1	2	3	4
Isolamento bacteriano de amostras de urina	-	-	+	+
PCR de amostras de urina	-	-	+	+
IDGA	-	-	+	+

Anexo 2 – Amostras de carneiros negativos e experimentalmente infectados testadas pelo ELISAi BP26r

2.1 – Resultados de carneiros negativos

Carneiro	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA* Diluições		
				1:20	1:40	1:80
1	-	-	-	0,501	0,364	0,243
2	-	-	-	0,730	0,571	0,360
3	-	-	-	0,512	0,402	0,301
4	-	-	-	0,970	0,735	0,508
5	-	-	-	0,678	0,474	0,285
6	-	-	-	0,813	0,676	0,531
7	-	-	-	0,484	0,353	0,238
8	-	-	-	0,854	0,721	0,595
9	-	-	-	0,987	0,813	0,579
10	-	-	-	0,458	0,346	0,262
11	-	-	-	0,868	0,707	0,486
12	-	-	-	0,670	0,461	0,355
13	-	-	-	0,342	0,277	0,181
14	-	-	-	0,992	0,826	0,620
15	-	-	-	0,644	0,500	0,366
16	-	-	-	0,805	0,635	0,472
17	-	-	-	0,578	0,423	0,336
18	-	-	-	0,850	0,633	0,399
19	-	-	-	0,890	0,674	0,635
20	-	-	-	0,882	0,684	0,494
21	-	-	-	0,963	0,761	0,503
22	-	-	-	1,024	0,700	0,478
23	-	-	-	0,658	0,578	0,389
24	-	-	-	0,718	0,594	0,394
25	-	-	-	0,837	0,635	0,431
26	-	-	-	0,650	0,516	0,328
27	-	-	-	1,013	0,696	0,590
28	-	-	-	0,744	0,524	0,348
29	-	-	-	0,631	0,616	0,409
30	-	-	-	0,916	0,656	0,456
31	-	-	-	0,897	0,65	0,421
32	-	-	-	0,892	0,581	0,412
33	-	-	-	0,891	0,594	0,420
34	-	-	-	0,715	0,551	0,343
35	-	-	-	0,782	0,456	0,387
36	-	-	-	0,873	0,539	0,359
37	-	-	-	0,865	0,631	0,469
38	-	-	-	0,988	0,681	0,488
39	-	-	-	0,758	0,651	0,454
40	-	-	-	0,691	0,493	0,318
41	-	-	-	0,849	0,665	0,481

2.2 – Resultados do carneiro infectado 1 (I1)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				1:20	1:40	1:80
Pré Inoculação	-	-	-	0,970	0,735	0,508
1ª pós-infecção	-	-	-	1,265	1,022	0,816
2ª	+	-	-	1,309	1,119	0,645
3ª	+	-	-	1,532	1,146	0,874
4ª	+	-	-	1,530	1,242	1,110
5ª	+	-	-	1,396	1,145	0,990
6ª	+	-	-	1,341	1,206	0,926
7ª	+	-	+	1,486	1,228	1,002
8ª	+	-	+	1,470	1,227	0,995
9ª	+	-	+	1,426	1,158	0,861
10ª	+	+	+	1,680	1,355	0,967
11ª	+	+	+	1,726	1,533	1,081
12ª	+	+	+	1,600	1,326	1,160
13ª	+	+	+	1,897	1,682	1,173
14ª	+	+	+	1,494	1,199	0,928
15ª	+	+	+	1,940	1,577	1,213
16ª	+	-	+	1,656	1,405	1,040
17ª	+	-	-	1,687	1,300	0,972
18ª	+	-	-	1,124	0,871	0,683
19ª	+	-	-	1,191	0,924	0,774
20ª	+	-	-	1,293	1,021	0,746
21ª	+	-	-	1,069	0,854	0,622
22ª	+	-	-	1,252	1,025	0,723
23ª	+	-	-	0,987	0,822	0,677
24ª	+	-	-	0,899	0,810	0,606

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

2.3 – Resultados do carneiro infectado 2 (I2)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				1:20	1:40	1:80
Pré Inoculação	-	-	-	0,678	0,474	0,285
1ª pós-infecção	-	-	-	0,872	0,635	0,473
2ª	-	-	-	0,895	0,676	0,472
3ª	-	-	-	0,858	0,707	0,483
4ª	+	-	-	0,921	0,755	0,595
5ª	+	-	-	1,235	1,035	1,009
6ª	+	-	-	0,889	0,782	0,494
7ª	+	-	-	0,841	0,587	0,424
8ª	+	-	-	0,887	0,685	0,419
9ª	+	-	-	0,865	0,609	0,440
10ª	+	+	-	0,926	0,633	0,529
11ª	+	+	-	1,055	0,738	0,511
12ª	+	+	+	1,067	0,769	0,541
13ª	+	+	+	1,268	0,942	0,650
14ª	+	+	+	1,303	1,028	0,777
15ª	+	+	+	1,286	1,005	0,796
16ª	+	+	+	1,163	0,852	0,546
17ª	+	+	-	1,079	0,887	0,596
18ª	+	+	-	0,921	0,630	0,459
19ª	-	-	-	0,959	0,703	0,490
20ª	-	-	-	0,872	0,691	0,443
21ª	-	-	-	0,953	0,853	0,493
22ª	-	-	-	0,877	0,600	0,465
23ª	-	-	-	0,781	0,628	0,414
24ª	-	-	-	0,923	0,663	0,467

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

2.4 – Resultados do carneiro infectado 3 (I3)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				Diluições		
				1:20	1:40	1:80
Pré-Inoculação	-	-	-	0,484	0,353	0,238
1ª pós-infecção	-	-	-	0,724	0,531	0,381
2ª	+	-	-	0,714	0,544	0,454
3ª	+	-	-	0,901	0,669	0,470
4ª	+	-	-	0,915	0,730	0,531
5ª	+	-	-	1,165	0,940	0,752
6ª	+	-	-	0,915	0,640	0,514
7ª	+	-	-	0,832	0,587	0,431
8ª	+	-	-	0,797	0,631	0,456
9ª	+	-	-	0,909	0,710	0,448
10ª	+	+	-	1,041	0,707	0,555
11ª	+	+	-	1,139	1,041	0,696
12ª	+	+	+	1,223	0,850	0,596
13ª	+	+	+	1,162	0,858	0,569
14ª	+	+	+	1,334	0,968	0,741
15ª	+	+	+	1,235	0,973	0,658
16ª	+	-	+	1,153	0,902	0,600
17ª	+	-	-	1,354	1,024	0,750
18ª	+	-	-	0,784	0,547	0,371
19ª	+	-	-	0,769	0,629	0,379
20ª	-	-	-	0,908	0,584	0,407
21ª	-	-	-	0,905	0,651	0,492
22ª	-	-	-	0,795	0,546	0,337
23ª	-	-	-	0,921	0,688	0,441
24ª	-	-	-	0,843	0,666	0,532

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

2.5 – Resultados do carneiro infectado 4 (I4)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				1:20	1:40	1:80
Pré-Inoculação	-	-	-	0,987	0,813	0,579
1ª pós-infecção	-	-	-	0,863	0,603	0,455
2ª	-	-	-	0,975	0,806	0,543
3ª	-	-	-	0,967	0,714	0,520
4ª	+	-	-	1,089	0,776	0,507
5ª	+	-	-	1,406	1,131	0,894
6ª	+	+	-	1,263	0,980	0,693
7ª	+	+	+	1,561	1,303	1,045
8ª	+	+	+	1,827	1,541	1,350
9ª	+	+	+	1,389	1,040	0,728
10ª	+	+	+	1,495	1,193	0,873
11ª	+	+	+	1,277	1,044	0,890
12ª	+	+	+	1,264	1,010	0,858
13ª	+	+	+	1,444	1,145	0,814
14ª	+	+	+	1,429	1,244	0,850
15ª	+	+	+	1,450	1,105	0,788
16ª	+	+	+	1,447	1,167	0,844
17ª	+	+	-	1,474	1,106	0,814
18ª	+	+	-	1,118	0,802	0,528
19ª	+	-	-	1,070	0,841	0,564
20ª	+	-	-	1,087	0,788	0,564
21ª	+	-	-	1,149	0,954	0,740
22ª	+	-	-	0,787	0,589	0,412
23ª	+	-	-	0,804	0,623	0,476
24ª	+	-	-	1,019	0,678	0,486

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

2.6 – Resultados do carneiro infectado 5 (I5)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				Diluição		
				1:20	1:40	1:80
Pré-Inoculação	-	-	-	0,670	0,461	0,355
1ª pós-infecção	-	-	-	0,566	0,446	0,355
2ª	-	-	-	1,087	0,816	0,616
3ª	+	-	-	1,369	1,111	0,886
4ª	+	+	-	1,421	1,072	0,790
5ª	+	+	+	1,640	1,335	0,968
6ª	+	+	+	2,383	2,179	2,101
7ª	+	+	+	1,825	1,740	1,707
8ª	+	+	+	1,719	1,352	0,945
9ª	+	+	+	1,859	1,653	1,498
10ª	+	+	+	1,933	1,899	1,710
11ª	+	+	+	2,409	2,004	1,958
12ª	+	+	+	1,819	1,795	1,555
13ª	+	+	+	2,165	1,880	1,500
14ª	+	+	+	2,547	2,379	2,213
15ª	+	+	+	2,318	1,861	1,708
16ª	+	+	+	1,720	1,535	1,157
17ª	+	+	+	1,414	1,098	0,852
18ª	+	+	+	1,267	0,947	0,636
19ª	-	-	+	1,092	0,851	0,567
20ª	-	-	+	0,979	0,746	0,547
21ª	-	-	-	1,456	1,085	0,787
22ª	-	-	-	1,148	0,961	0,552
23ª	-	-	-	1,100	0,786	0,548
24ª	-	-	-	1,019	0,776	0,466

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.



2.7 – Resultados do carneiro infectado 6 (I6)

Semana	IDGA	PCR	Isolamento bacteriano	ELISA*		
				Diluições		
				1:20	1:40	1:80
Pré-Inoculação	-	-	-	0,854	0,721	0,595
1ª pós-infecção	+	-	-	1,084	0,781	0,618
2ª	+	-	-	1,668	1,417	1,028
3ª	+	-	-	2,277	2,078	1,769
4ª	+	+	+	2,951	2,926	2,37
5ª	+	+	+	1,465	1,186	0,818
6ª	+	+	+	1,904	1,409	1,184
7ª	+	+	+	2,070	2,014	1,840
8ª	+	+	+	2,442	2,250	1,918
9ª	+	+	+	1,969	1,874	1,779
10ª	+	+	+	2,821	2,781	2,792
11ª	+	+	+	2,089	2,077	1,887
12ª	+	+	+	2,010	1,891	1,716
13ª	+	+	+	2,837	2,567	2,434
14ª	+	+	+	2,729	2,337	1,846
15ª	+	+	+	1,796	1,643	1,217
16ª	+	+	+	2,359	1,901	1,482
17ª	+	+	+	1,750	1,510	1,242
18ª	+	+	+	1,918	1,674	1,285
19ª	+	-	+	1,819	1,487	1,213
20ª	+	-	+	1,621	1,216	0,946
21ª	+	-	+	1,868	1,450	1,253
22ª	+	-	+	1,683	1,299	0,876
23ª	+	-	+	1,717	1,367	1,040
24ª	+	-	+	1,714	1,274	1,011

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

Anexo 3 – Amostras de ovinos negativos e positivos somente à IDGA testadas pelo ELISAi BP26r

Ovinos	Nº	IDGA	ELISA*		
			Diluições		
			1:20	1:40	1:80
	1	-	0,501	0,364	0,243
	2	-	0,730	0,571	0,360
	3	-	0,512	0,402	0,301
	4	-	0,970	0,735	0,508
	5	-	0,678	0,474	0,285
	6	-	0,813	0,676	0,531
	7	-	0,484	0,353	0,238
Negativos	8	-	1,053	0,940	0,660
	9	-	0,987	0,813	0,579
	10	-	1,228	0,960	0,752
	11	-	1,007	0,793	0,630
	12	-	0,992	0,826	0,620
	13	-	0,851	0,659	0,468
	14	-	0,743	0,595	0,405
	15	-	0,861	0,664	0,408
	16	-	0,816	0,550	0,347
	17	-	0,793	0,535	0,347
	18	-	0,504	0,377	0,237
	19	-	0,622	0,462	0,341
	20	-	0,797	0,526	0,334
	21	-	0,527	0,460	0,354
	22	-	0,611	0,484	0,396
	23	-	0,838	0,633	0,452
	24	-	0,801	0,580	0,410
	25	-	0,724	0,501	0,421
	26	-	0,579	0,419	0,251
	27	-	0,415	0,277	0,189
	28	-	0,931	0,627	0,365
	29	-	0,929	0,669	0,443
	30	-	0,902	0,699	0,540
	31	-	0,687	0,443	0,343
	32	-	1,34	1,028	0,721
	33	-	0,610	0,416	0,285
	34	-	0,613	0,500	0,352
	35	-	0,661	0,612	0,562
	36	-	0,625	0,411	0,292
	37	-	1,093	0,881	0,662
	38	-	0,881	0,694	0,485
	39	-	0,708	0,615	0,481
	40	-	1,185	0,887	0,668
	41	-	0,798	0,686	0,509
	42	-	0,861	0,661	0,462
	43	-	0,458	0,346	0,262
	44	-	0,868	0,707	0,486
	45	-	0,342	0,277	0,181

Anexo 3 - Amostras de ovinos negativos e positivos somente à IDGA testadas pelo ELISAi BP26r (continuação).

Ovinos	Nº	IDGA	ELISA*		
			Diluição		
			1:20	1:40	1:80
	46	-	1,065	0,858	0,680
	47	-	0,731	0,580	0,410
	48	-	0,528	0,466	0,334
	49	-	0,746	0,572	0,429
	50	-	0,840	0,631	0,432
	51	-	0,656	0,464	0,364
	52	-	0,668	0,478	0,351
	53	-	0,654	0,443	0,309
	54	-	0,881	0,671	0,455
Negativos	55	-	0,478	0,445	0,253
	56	-	0,585	0,369	0,251
	57	-	0,843	0,510	0,396
	58	-	0,616	0,528	0,374
	59	-	0,838	0,695	0,457
	60	-	0,611	0,440	0,345
	61	-	0,595	0,441	0,308
	62	-	0,881	0,605	0,427
	63	-	0,603	0,429	0,265
	64	-	0,905	0,674	0,399
	65	-	1,048	0,633	0,412
	66	-	0,729	0,468	0,333
	67	-	0,854	0,556	0,366
	68	-	0,758	0,547	0,361
	69	-	0,691	0,496	0,305
	70	-	1,042	0,729	0,463
	71	-	0,722	0,483	0,301
	72	-	0,678	0,537	0,384
	73	-	0,932	0,742	0,429
	74	-	0,842	0,568	0,373
	75	-	0,618	0,471	0,320
	76	-	0,503	0,371	0,284
	77	-	0,420	0,303	0,240
	78	-	0,790	0,525	0,331
	79	-	0,679	0,530	0,320
	80	-	0,576	0,428	0,296
	81	-	0,791	0,522	0,303
	82	-	0,821	0,570	0,362

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.

Anexo 3 - Amostras de ovinos negativos e positivos somente à IDGA testadas pelo ELISAi BP26r (continuação).

Ovinos	Nº	IDGA	ELISA*		
			1:20	1:40	1:80
	83	+	0,990	0,892	0,762
	84	+	1,300	1,124	0,918
	85	+	1,368	1,138	0,880
	86	+	0,936	0,705	0,546
	87	+	1,114	1,039	0,803
	88	+	0,979	0,835	0,633
	89	+	1,348	0,960	0,645
	90	+	1,032	0,847	0,684
	91	+	0,826	0,743	0,551
	92	+	1,444	1,187	0,841
Positivos	93	+	1,264	0,964	0,785
	94	+	1,127	0,817	0,544
	95	+	2,000	2,064	1,904
	96	+	1,353	1,081	0,777
	97	+	1,347	0,940	0,628
	98	+	0,864	0,672	0,527
	99	+	1,259	0,782	0,481
	100	+	0,901	0,662	0,44
	101	+	0,96	0,648	0,366
	102	+	1,232	0,821	0,504
	103	+	1,120	0,861	0,673
	104	+	1,074	0,914	0,708
	105	+	1,040	0,854	0,564
	106	+	1,500	1,250	0,802
	107	+	1,604	1,227	0,864
	108	+	1,231	0,900	0,573
	109	+	1,576	1,179	0,858
	110	+	1,531	1,437	1,199
	111	+	0,985	0,715	0,489
	112	+	1,359	0,966	0,729
	113	+	1,126	0,819	0,601
	114	+	1,123	0,813	0,528
	115	+	1,353	1,095	0,814
	116	+	0,879	0,736	0,629
	117	+	0,802	0,704	0,469
	118	+	1,064	0,868	0,818
	119	+	0,811	0,642	0,432
	120	+	1,057	0,835	0,580
	121	+	1,152	0,892	0,631
	122	+	0,931	0,537	0,334
	123	+	0,735	0,510	0,354
	124	+	0,986	0,772	0,628

\*Pontos de corte: 1:20 (0,983); 1:40 (0,7) e 1:80 (0,497). Valores calculados pela soma da média de 10 repetições do negativo + 2x o desvio padrão do negativo.