

Mariana Noyma Xavier

**DESENVOLVIMENTO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA O
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS* E AVALIAÇÃO
COMPARATIVA DE MÉTODOS SOROLÓGICOS**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

Dissertação defendida e aprovada em 13 de julho de 2009, pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(orientador)

Profa. Jane Megid

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Prof. Andrey Pereira Lage

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”
(Leonardo da Vinci)

Aos meus amores: meu pai Paulo Afonso, minha mãe Wilma e minhas irmãs Thaís e Sílvia, pela compreensão e por acreditarem junto comigo que mais esta conquista seria possível.

Agradecimentos

A Deus, por ser a luz que ilumina meu caminho.

Ao Lucas, pelo apoio, paciência, amor e companheirismo.

Ao Prof. Renato de Lima Santos, por sua orientação, preocupação com meu crescimento e por ser não só um exemplo de profissional, mas também de ser humano.

À Profa. Renee Tsolis, pela ajuda na execução do projeto e fornecimento de dados valiosos.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, por sua disposição em ajudar e pelo auxílio na execução do experimento.

Ao Prof. Luis Antônio Mathias, por abrir as portas do seu laboratório para a realização dos testes de fixação de complemento.

Aos Drs. Carlos Robles e Maurício Dasso, por fornecerem amostras e antígenos para a realização dos experimentos.

Ao prof. Francisco Lobato, por ceder seu laboratório para realização de parte do experimento.

Aos companheiros de pós-graduação Tatiane, Érica, Teane, Valéria, Custódio e Luciana, à técnica Adriana e aos alunos de iniciação científica Felipe, Fernanda e Estephane pela valiosa ajuda na execução deste projeto.

A Tatiane, Fabiana e Alcina, alunas de pós-graduação na minha época de iniciação científica, pela paciência em me ensinar.

A Teane, Érica, Tatiane, Valéria, Ana Luiza, Juliana e Luciana, amigas queridas do setor de patologia, pelo apoio, companheirismo e momentos divertidos durante o meu mestrado.

Aos professores, demais colegas e funcionários do setor de patologia, pelos ensinamentos, companhia, e por dividirem comigo esse período tão importante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo e financiamento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	15
1. INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA OVIS</i>	15
1.1- Agente etiológico	15
1.2- Epidemiologia	15
1.3- Manifestações clínicas	17
1.4- Patogênese e patologia	18
2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA OVIS</i>	19
2.1- Exame clínico	19
2.2- Métodos sorológicos	20
2.3- Isolamento bacteriano	21
2.4- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	22
3. CONTROLE DA INFECÇÃO POR <i>BRUCELLA OVIS</i>	23
CAPÍTULO II: Desenvolvimento e avaliação de método de PCR espécie-específico para diagnóstico da infecção por <i>Brucella ovis</i> em amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de carneiros	25
1. Introdução	25
2. Material e métodos	26
3. Resultados e discussão	29
4. Conclusão	43
CAPÍTULO III: Comparação entre dois métodos de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e um método de Fixação de Complemento (FC) para o diagnóstico sorológico da infecção por <i>Brucella ovis</i> em carneiros	44
1. Introdução	44
2. Material e métodos	44
3. Resultados e discussão	45
4. Conclusão	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequências dos inicializadores específicos para <i>B. ovis</i> utilizados neste estudo.	31
Tabela 2.	Resultados de amplificação de 12 produtos específicos de PCR utilizando DNA de diferentes bactérias causadoras de epididimite em ovinos ou filogeneticamente relacionados à <i>Brucella ovis</i> .	33
Tabela 3.	Resultados de sensibilidade analítica utilizando amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiro livre de <i>Brucella ovis</i> artificialmente inoculadas com concentrações variando de 10^0 a 10^6 UFC/mL.	34
Tabela 4.	Frequência de amostras positivas para <i>Brucella ovis</i> em carneiros experimentalmente infectados, após 180 dias de inoculação.	38
Tabela 5.	Frequência de concordância e valores de kappa para PCR e bacteriologia de amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de carneiros experimentalmente infectados por <i>Brucella ovis</i> .	41
Tabela 6.	Frequência de concordância e valores de kappa para PCR, bacteriologia e teste sorológico (ELISA) de amostras de sêmen e soro de carneiros naturalmente infectados por <i>Brucella ovis</i> .	41
Tabela 7.	Sensibilidade dos métodos de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) utilizando antígeno TECPAR (IGDA TECPAR) e antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e prova de fixação de complemento (FC) para <i>B. ovis</i> ao longo de 6 meses de infecção experimental.	49
Tabela 8.	Frequência de concordância e valores de kappa para os métodos sorológicos de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) utilizando antígeno TECPAR (IGDA TECPAR) e antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e prova de fixação de complemento (FC) para <i>B. ovis</i> em amostras de soro ovino.	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultado representativo (ORFs AO496, AO503 e AO504) da amplificação das seqüências das 12 ORF nas seis espécies clássicas do gênero *Brucella*. NTC: controle negativo, sem adição de DNA genômico à reação; IC: controle interno – reação de PCR com iniciadores para gene BR0615, gene sabidamente conservado em todas as espécies do gênero *Brucella*. 32
- Figura 2.** Resultados representativos (ORF AO496) de amplificação das 12 ORF utilizando 18 isolados de campo de *B. ovis*. NTC: controle negativo, sem adição de DNA genômico à reação. 32
- Figura 3.** Resultados representativos (ORF AO503) de sensibilidade analítica utilizando amostras de urina de carneiro livre de *Brucella ovis* artificialmente inoculada com concentrações variando de 10^0 a 10^6 UFC/mL. M: marcador de peso molecular; C+: controle positivo, DNA puro de cultura de *B. ovis*; C-: controle negativo, sem DNA genômico na reação. 34
- Figura 4.** Frequência de animais positivos para *B. ovis* em teste sorológico de IDGA ao longo de 180 dias, após infecção experimental 35
- Figura 5.** Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de sêmen ao longo de 180 dias de infecção experimental. 36
- Figura 6.** Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de urina ao longo de 180 dias de infecção experimental. 36
- Figura 7.** Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de lavado prepucial ao longo de 180 dias de infecção experimental. 37
- Figura 8.** Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de sêmen, urina ou lavado prepucial ao longo de 180 dias de infecção experimental. 37
- Figura 9.** Frequência de amostras de órgãos positivas por PCR e bacteriologia em carneiros experimentalmente infectados por *Brucella ovis*, eutanasiados aos 192 dias pós-infecção. 42
- Figura 10.** Frequência de carneiros soropositivos para os testes de IDGA antígeno TECPAR (IDGA TECPAR), IDGA antígeno Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e fixação de complemento (FC) para *Brucella ovis* ao longo de 192 dias de infecção experimental. 47

- Figura 11.** Títulos médios de anticorpos anti-*B. ovis* pela prova de fixação de complemento (FC) em soro de carneiros ao longo de 192 dias de infecção experimental. **47**

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Resultados de infecção experimental por tipo de amostra

- Anexo A1.** Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de sêmen de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção. **58**
- Anexo A2.** Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de urina de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção. **59**
- Anexo A3.** Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de lavado prepucial de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção. **60**
- Anexo A4.** Resultados de sorologia (ELISA), bacteriologia e PCR de animais pertencentes a rebanhos naturalmente infectados por *Brucella ovis*. **61**
- Anexo A5.** Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de órgãos de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* eutanasiados aos 192 dias pós-infecção. **62**

ANEXO B - Resultados de infecção experimental por animal

- Anexo B1.** Carneiro 1. **64**
- Anexo B2.** Carneiro 2. **64**
- Anexo B3.** Carneiro 3. **65**
- Anexo B4.** Carneiro 4. **65**
- Anexo B5.** Carneiro 5. **66**
- Anexo B6.** Carneiro 6. **66**
- Anexo B7.** Carneiro 7. **67**
- Anexo B8.** Carneiro 8. **67**
- Anexo B9.** Carneiro 9. **68**

RESUMO

O presente estudo objetiva desenvolver um método diagnóstico espécie-específico para a infecção por *Brucella ovis* baseado em PCR e avaliar três testes sorológicos disponíveis, a IDGA utilizando 2 antígenos e a FC, para o diagnóstico desta enfermidade. Foram utilizadas 12 janelas de leitura (ORF) como sequências-alvo de amplificação. Amostras de soro, sangue, sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de 9 carneiros experimentalmente infectados foram obtidas ao longo de 180 dias de infecção. Adicionalmente, amostras biológicas de 8 animais provenientes de rebanho livre da doença, além de 40 amostras de sêmen provenientes de rebanhos naturalmente infectados foram obtidas. O método de PCR apresentou limite de detecção de 10^2 , 10^1 , 10^0 UFC/mL em amostras de sêmen, urina e lavado prepucial, respectivamente. Valores semelhantes de sensibilidade e especificidade foram encontrados para o método de PCR quando comparado ao isolamento bacteriano para as amostras testadas. As IDGAs apresentaram valores de sensibilidade e especificidade semelhantes entre si e estatisticamente superiores à FC. Os resultados indicam que primeiro método de PCR espécie-específico demonstrou ser eficiente para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* em amostras biológicas de carneiros infectados. Além disso, a IDGA deve ser preferida à FC para o diagnóstico desta enfermidade com os antígenos avaliados.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, epididimite, PCR, sêmen, urina

ABSTRACT

The goal of this study was to develop a PCR test targeting specific *B. ovis* genomic sequences to be applied in biological samples from rams and to evaluate three serological tests, AGID using two antigens and CF, available in for the diagnosis of ovine brucellosis. Specific primer pairs were designed targeting 12 open reading frames (ORF). Blood, serum, semen, urine, preputial wash, and organs samples were collected from experimentally infected rams through 180 days post infection. Moreover, biological samples from eight rams belonging to *B. ovis*-free flock as well as 40 semen samples from rams belonging to naturally infected flocks were obtained. The limit of detection of this PCR protocol was 10^2 , 10^1 , 10^0 CFU/mL for semen, urine and preputial wash samples, respectively. Similar sensibility and specificity values were obtained by this PCR method when compared to bacteriology using the biological samples. Both ID test presented similar sensitivity and specificity values and, both methods were statistically more efficient than CF test for the serological diagnosis of *B. ovis* infection. The results clearly indicate that this first specific PCR method is highly efficient for the diagnosis of *B. ovis* infection in biological samples from infected rams. Additionally, ID should be used, rather than CF, for the serological diagnosis of this disease with the antigens evaluated.

Key-words: *Brucella ovis*, epididymitis, PCR, semen, urine

INTRODUÇÃO

A brucelose ovina, causada pela *Brucella ovis*, é uma doença infecto-contagiosa de distribuição mundial (Burguess, 1982). O agente é um coco-bacilo Gram negativo filogeneticamente relacionado ao grupo das α -proteobactérias. A enfermidade se caracteriza clinicamente por epididimite crônica e infertilidade em carneiros (Biberstein et al., 1964; Searson, 1987) e ocasionalmente, aborto em ovelhas e nascimento de cordeiros fracos (Mollelo et al., 1963; Osbourn e Kennedy, 1966). Portanto, a infecção por *B. ovis* resulta em perdas econômicas significativas para os sistemas de produção de ovinos, em decorrência das falhas reprodutivas e descarte precoce de animais (McGowan e Devine, 1960; Webb et al., 1980).

O termo epididimite contagiosa ovina vem sendo erroneamente empregado para designar a infecção por *B. ovis* em carneiros. Apesar de esta bactéria ser reconhecida como o principal agente de epididimite em carneiros sexualmente maduros, diversos outros organismos podem causar alterações clínicas e lesões semelhantes àquelas causadas pela *B. ovis*, como o *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *A. actinomycetemcomitans*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entre outros, principalmente em animais mais jovens (Burguess, 1982; Walker et al., 1986).

Há um consenso geral entre pesquisadores de que a excreção de *B. ovis* no sêmen de carneiros infectados seja um fator importante na epidemiologia desta enfermidade (Burguess, 1982). Consequentemente, a transmissão da doença ocorre principalmente por via venérea, na qual a fêmea atua de forma passiva, e por contato direto entre carneiros infectados

(Hartley et al., 1955; Brown et al., 1973; Ridler et al., 2002). Portanto, ao contrário do que ocorre na brucelose bovina, a manutenção da infecção por *B. ovis* em um rebanho ocorre principalmente através do macho infectado, e este também é o principal responsável pela transmissão da infecção entre os animais. Por esta razão, o diagnóstico da brucelose ovina causada por *B. ovis* deve ser realizado fundamentalmente nos machos da propriedade a ser investigada (Robles, 2008).

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado através de uma associação entre exame clínico, métodos sorológicos e isolamento bacteriano em amostras de sêmen (Webb et al., 1980; Burguess, 1982). Os métodos sorológicos mais empregados são a fixação de complemento (FC), a imunodifusão em gel de agar (IDGA) e testes imunoenzimáticos (ELISA) (Burguess, 1982; Blasco, 1990). Testes sorológicos podem apresentar resultados falso-negativos, principalmente em casos de animais cronicamente infectados (Hicks et al., 1978; West e Bruce, 1991). Apesar de ser considerado o diagnóstico definitivo para a infecção, o isolamento bacteriano pode ser ineficaz em detectar animais infectados, uma vez que a eliminação do agente no sêmen é intermitente e animais infectados e soropositivos podem não excretar a bactéria (Laws et al., 1972; Webb et al., 1980; Burguess, 1982).

As falhas nos testes diagnósticos convencionais levaram pesquisadores a desenvolver métodos moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) baseados em amplificação de fragmentos de DNA de *B. ovis* em amostras de sêmen de animais infectados (Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007). Embora o método de PCR tenha mostrado sensibilidade semelhante ao isolamento bacteriano, a sequência-alvo de DNA utilizada é conservada no genoma de todas as espécies clássicas do gênero

Brucella. Portanto, as técnicas de PCR utilizadas para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* até o presente momento são incapazes de diferenciar a infecção por *B. ovis* da infecção por outras espécies de *Brucella* que infectam ovinos, como *B. melitensis*.

No Brasil, o crescimento acelerado de rebanhos ovinos voltados para o corte e a crescente exigência do comércio internacional para o controle sanitário animal, criaram uma demanda significativa de métodos de diagnósticos eficazes para as doenças infecto-contagiosas dos animais de produção. Porém, há pouca disponibilidade de imunorreagentes no mercado nacional para realização de diagnóstico de doenças de importância econômica na ovinocultura, incluindo a brucelose ovina por *B. ovis* (Marques, 2006).

Para que haja um controle adequado e erradicação efetiva de uma enfermidade, é essencial que métodos de diagnóstico eficientes estejam disponíveis (Webb et al., 1980). Portanto, diante da alta demanda por métodos eficazes para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* e da ausência de uma técnica de PCR espécie-específica para esta doença, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método diagnóstico espécie-específico baseado em PCR para amostras biológicas de carneiros e avaliar três testes sorológicos disponíveis no Brasil para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis*. Cabe salientar que este projeto resultou recentemente no depósito de um pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) para o método de diagnóstico da infecção por *B. ovis* espécie-específico desenvolvido e validado com base na presente dissertação (“Método diagnóstico espécie-específico de *Brucella ovis* e kit diagnóstico para detecção de *Brucella ovis* através de reação em cadeia da polimerase (PCR)”. Protocolo INPI número: 014080007113).

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*

Agente etiológico

Bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são consideradas parasitas intracelulares facultativos, principalmente de células fagocíticas profissionais como macrófagos, podendo ser encontradas em outros tipos celulares como trofoblastos e linfócitos *B.* Estes agentes são filogeneticamente relacionados a outros microorganismos simbióticos, patógenos de plantas e de animais do grupo das α -proteobactérias (Halling et al., 2005).

As primeiras evidências da atuação de *B. ovis* como agente patogênico para ovinos são datadas do início dos anos 1950. A ocorrência de aborto em ovelhas, associada ao isolamento de microorganismos com morfologia de coco-bacilos foi descrita na Nova Zelândia por McFarlane e colaboradores (1952a). Subsequentemente, McFarlane e colaboradores (1952b) concluíram que os organismos previamente isolados eram responsáveis por aborto em ovelhas e epididimite em carneiros. O mesmo organismo foi isolado nos anos seguintes em outros países como Austrália (Simmons e Hall, 1953), Estados Unidos (McGowan e Schultz, 1956) e África do Sul (Van Rensburg et al., 1958). Em 1953, Buddle e Boyes (1953) caracterizaram o isolado neozelandês como pertencente ao gênero *Brucella* e, três anos depois, o organismo foi denominado *Brucella ovis* (Buddle, 1956).

A *B. ovis* é considerada uma bactéria com morfologia de coco-bacilo Gram negativo pequeno, de aproximadamente 0,5 a 0,7 por 0,6 a 1,5 μm . Não apresenta cápsula, não é móvel, não forma endosporos e não apresenta coloração bipolar. O crescimento

ótimo ocorre quando as culturas são encubadas em atmosfera contendo 10% de CO_2 a 37°C (Burgess, 1982). Em meios sólidos, o crescimento ocorre entre 5 a 7 dias de incubação e as colônias apresentam por volta de 2 mm de diâmetro, coloração acinzentada, morfologia circular, convexa, macia e de superfície brilhante. Para que haja crescimento adequado, o meio deve ser enriquecido com soro ou sangue (Burgess, 1982). A *B. ovis* apresenta morfologia colonial permanentemente rugosa, diferentemente de outras espécies clássicas de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*), que possuem aspecto liso (Alton et al., 1988). Tal fato pode ser explicado pela ocorrência de lipopolissacarídeo (LPS) de parede celular incompleto na *B. ovis*, resultado da ausência da cadeia O no LPS desta espécie (Diaz et al., 1967).

Epidemiologia

A infecção por *B. ovis* apresenta distribuição mundial, e está presente em todas as áreas onde a ovinocultura possui importância econômica, com exceção da Grã-Bretanha (Burgess, 1982). Levantamentos sorológicos em diferentes regiões do mundo demonstraram que a prevalência da doença em rebanhos varia entre 9,1 e 46,7% (Sergeant, 1994) e, a prevalência em carneiros dentro de um rebanho infectado varia entre 2,1 e 67 % (Sergeant, 1994; Torres et al., 1997; Robles et al., 1998). No Brasil, a presença da doença foi descrita em diferentes estados. Estudos provenientes do estado do Rio Grande do Sul apontaram a prevalência média de 13,4% (com variação de 6,9 a 50%) de carneiros infectados em rebanhos positivos (Cardoso et al., 1989; Magalhães Neto e Gil-Turnes, 1996). Em estados do Nordeste brasileiro, onde a ovinocultura tem importância econômica considerável, a soroprevalência de animais

positivos variou de 5,57 a 34% (Silva et al., 2003; Clementino et al., 2007). Levantamentos sorológicos realizados em 18 rebanhos do estado de São Paulo revelaram a ausência de evidência sorológica da infecção por *B. ovis* nos 15 municípios avaliados (Marinho e Mathias, 1996). Estudo recente realizado no estado de Minas Gerais por Marques (2006) demonstrou que 29,4% das propriedades mineiras apresentam animais soropositivos para *B. ovis* e, dentro das propriedades positivas, uma média de 5,3% dos animais são reagentes aos testes sorológicos.

A infecção natural por *B. ovis* é considerada praticamente exclusiva de ovinos domésticos (Santos et al., 2005) com menor soroprevalência em carneiros da raça Merino (Sergeant, 1994). Porém, a infecção pode também ocorrer de forma natural em cervídeos (*Cervus elaphus*, *Odocoileus virginianus*) (Barron et al., 1985; Ridler e West, 2002) e carneiros selvagens (*Ovis musimon*) originários da Sardenha e Córsega (Cerri et al., 2002). Enquanto os carneiros selvagens aparentemente são resistentes à doença, em cervídeos, o quadro clínico observado é semelhante àquele descrito em ovinos domésticos (Ridler et al., 2002). O ovino doméstico é, inclusive, capaz de transmitir a infecção para os cervídeos quando ambas as espécies são mantidas no mesmo piquete (Ridler et al., 2000). Caprinos podem ser experimentalmente infectados por *B. ovis* e são capazes de eliminar a bactéria no sêmen. Este fato pode ter algum significado epidemiológico quando esta espécie é mantida em contato direto com ovinos (Burguess et al., 1985). Dentre as espécies de animais de laboratório experimentalmente infectadas, o gerbil (*Meriones unguiculatus*) apresentou o maior potencial para ser utilizado como modelo de infecção por *B. ovis* (Cuba-Caparaó e Myers, 1973).

Walker e colaboradores (1986) demonstraram que a ocorrência de brucelose

ovina por *B. ovis* é mais comum em animais sexualmente maduros, com isolamento de *B. ovis* em 79,5% dos casos de lesões epididimárias em carneiros acima de 18 meses de vida. Porém, a doença pode ocorrer em animais jovens, com até quatro meses de idade (Burguess, 1982) e em rebanhos jamais utilizados para reprodução (Bulgin, 1990).

A presença do agente no sêmen de animais infectados é considerada a principal fonte de infecção da doença (Burguess, 1982). Acredita-se que a transmissão natural da brucelose ovina por *B. ovis* ocorra primariamente por via venérea ou infecção de membranas mucosas, primariamente peniana, prepucial, retal e nasal (Burguess, 1982), apesar de todas as vias de transmissão da enfermidade não serem conhecidas (Paolicchi, 2001). Hartley e colaboradores (1955) demonstraram o papel importante da fêmea infectada na transmissão da bactéria, quando esta copula com um carneiro susceptível após copular com um carneiro infectado no mesmo período de estro. Padrão semelhante de transmissão foi observado entre cervídeos (*Cervus elaphus*) (Ridler et al., 2002). O contato de animais susceptíveis com placenta contaminada não representa um risco importante de infecção, ao contrário do que ocorre na brucelose bovina (Hartley et al., 1955). A transmissão natural da doença ainda pode acontecer por contato direto entre carneiros, ou carneiros e cervídeos, mantidos no mesmo piquete ou baia (Brown et al., 1973, Ridler et al., 2000). Neste caso, a infecção ocorre através do ambiente contaminado por secreções de animais ou, principalmente, através do comportamento homossexual exacerbado desta espécie, evidenciado pela observação de fezes em prepúcio de carneiros mantidos com outros machos (Hartley et al., 1955; Burguess et al., 1982).

A infecção experimental de carneiros com *B. ovis* foi realizada por inoculação

intratesticular (Buddle e Boyes, 1953; Simmons e Hall, 1953) ou intravenosa (Buddle e Boyes, 1953). O uso de sêmen sabidamente infectado ou de suspensão contendo microorganismos viáveis também foi eficiente em reproduzir a doença quando a inoculação foi realizada por diferentes vias: intraprepucial (Buddle e Boyes, 1953; Simmons e Hall, 1953; Laws et al., 1972; Webb et al., 1980), intraconjuntival (Biberstein et al., 1964; Brown et al., 1973) e intranasal (Burguess, 1982). Nestes estudos, o percentual de carneiros que apresentaram evidências sorológicas, bacteriológicas e clínicas da doença variou entre 68 e 100%. Em fêmeas, infecções experimentais utilizando via intravenosa (McFarlane et al., 1952^a; Buddle e Boyes, 1953; Molello et al., 1963), via intraconjuntival (McGowan et al., 1961) ou intravaginal (Muhammed et al., 1975) resultaram em morte fetal esporádica e ocorrência de natimortos e nascimento de cordeiros fracos.

Manifestações clínicas

Animais acometidos pela brucelose ovina por *B. ovis* apresentam primariamente alterações de órgãos sexuais, com ênfase para os epidídimos (Burguess, 1982). Frequentemente, a cauda do epidídimo, e por vezes o corpo e a cabeça do órgão, apresenta aumento de volume unilateral com consistência firme à palpação (Cameron e Lauerman, 1976; Blasco, 1990). Os testículos podem apresentar consistência flácida e diminuição de volume em decorrência de degeneração testicular secundária à alteração epididimária. As glândulas acessórias, notoriamente a vesícula seminal, são também afetadas (Foster et al., 1987), porém suas alterações clínicas são pouco evidentes em um exame rotineiro. Os sinais clínicos iniciais, característicos de infecção aguda como febre, perda de apetite e respiração agitada também não são usualmente notados (Robles, 2008). Não se sabe ao certo quando

as primeiras lesões epididimárias palpáveis começam a aparecer em animais naturalmente infectados a campo. Em animais submetidos à infecção experimental, as lesões tendem a aparecer entre 15 e 45 dias pós-inoculação (Robles, 2008).

A remissão dos sinais clínicos após algumas semanas de infecção é frequentemente relatada (Laws et al., 1972; Burgess, 1982; Worthington et al., 1985; Plant et al., 1986), apesar de o sêmen destes animais continuar a apresentar baixa qualidade (Cameron e Lauerman, 1976). Hughes e Claxton (1968) descrevem a eliminação de *B. ovis* no sêmen de animais clinicamente normais por longos períodos. Estes animais assintomáticos podem, inclusive, apresentar fertilidade normal representando um risco importante para a disseminação da doença no rebanho.

A infecção por *B. ovis* resulta em alterações significativas dos parâmetros espermáticos (Burguess et al., 1982) mais evidentes quanto mais acentuadas forem as lesões nos epidídimos (Cameron e Lauerman, 1976). As alterações clínicas decorrentes da infecção levam a diminuição do número de espermatozoides no ejaculado, diminuição de motilidade dos mesmos e aumento de patologias espermáticas (Cameron e Lauerman, 1976; Cardoso et al., 1989; Ridler et al., 2002). As alterações espermáticas mais observadas são defeitos de peça intermediária e de cauda, além de cabeças isoladas (Kimberling et al., 1986).

Em fêmeas, a principal alteração clínica descrita é a ocorrência de aborto e nascimento de cordeiros fracos (Burguess, 1982). Os abortos, se presentes (Muhammed et al., 1975), tendem a acontecer em torno de 30 dias após o início da gestação (Osburn e Kennedy, 1966), podendo acometer 39% de ovelhas gestantes inoculadas experimentalmente (Meinershagen et al., 1974). Infecções experimentais demonstraram ainda que a infecção por *B. ovis* pode resultar em até 29% de nascimento

de cordeiros fracos ou natimortos (Grilló et al., 1999), e em comprometimento do desempenho reprodutivo da ovelha em decorrência de vaginite e endometrite devido à transmissão do agente por ocasião da cópula (Homes et al., 1994).

Patogênese e patologia

Assim como descrito para outras espécies do gênero (Carvalho Neta et al., 2009; Xavier et al., 2009b), a *B. ovis* possui capacidade de sobrevivência e multiplicação em células fagocíticas, notoriamente macrófagos (Paolicchi, 2001). Estudo de patogênese realizado por Biberstein et al. (1964) baseado em bacteriologia de órgãos em diferentes tempos após inoculação experimental de carneiros via intraconjuntival, demonstrou uma progressão lenta da infecção. Aparentemente, o agente desencadeia uma infecção local na mucosa exposta por aproximadamente 30 dias, quando então evolui para um processo regional, acometendo os linfonodos próximos à mucosa afetada. O estágio bacterêmico somente se instala por volta de dois meses pós-infecção, quando o organismo atinge o trato genital, baço, rins e fígado, e passa a sobreviver nestes órgãos por tempo indeterminado.

Uma vez presente no trato genital do animal afetado, a eliminação de *B. ovis* principalmente pelo sêmen passa a ocorrer (Burguess, 1982). Nem todo carneiro infectado excreta o organismo no sêmen, e a excreção, na maioria das vezes, ocorre de forma intermitente (Laws et al., 1972; Webb et al., 1980; Worthington et al., 1985; West e Bruce, 1991). Biberstein e colaboradores (1964) descreveram a excreção de *B. ovis* no sêmen por períodos superiores a seis meses em 45 de 48 animais inoculados via intraconjuntival. Já Laws e colaboradores (1972) demonstraram a presença do agente no sêmen de somente 6 de 25 animais experimentalmente infectados.

A *B. ovis* pode ser ocasionalmente isolada de sítios sistêmicos de infecção como baço, fígado, rins, pulmão e linfonodos (Laws et al., 1972; Worthington et al., 1984; Searson, 1987). Apesar de haver colonização por vezes significativa destes sítios pelo agente, lesões evidentes tanto macroscopicamente quanto microscopicamente não são descritas (Burguess, 1982; Searson, 1987). Portanto, a importância dos órgãos sistêmicos está relacionada exclusivamente à persistência da bactéria no animal afetado, e não à ocorrência de lesões que possam ser relacionadas à presença da bactéria no tecido (Biberstein et al., 1964).

No carneiro, as lesões resultantes de brucelose ovina por *B. ovis* com confirmação bacteriológica, estão concentradas principalmente na cauda do epidídimo (Searson, 1987), ampola do ducto deferente e glândula vesicular (Foster et al., 1987). Alterações macroscópicas são geralmente observadas nos epidídimos após a formação de granuloma espermático (Santos et al., 2005), em consequência de estase espermática e subsequente extravasamento de esperma para o interstício (Burguess, 1982). Este extravasamento pode desencadear uma reação imune anti-espermática, com possíveis implicações na patogênese da infertilidade associada à infecção por *B. ovis* (Paolicchi et al., 2000). As glândulas vesiculares podem apresentar aumento de volume, com ductos preenchidos por líquido, e a interrupção da espermatogênese pode resultar em atrofia testicular (Santos et al., 2005).

Microscopicamente, o epidídimo afetado apresenta edema intersticial, fibrose e infiltração perivascular de linfócitos e plasmócitos (Searson et al., 1987; Santos et al., 2005). Já as lesões histológicas de glândulas vesiculares e ampolas afetadas consistem de infiltrado inflamatório intersticial e intraepitelial de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e raros neutrófilos (Foster et al., 1987). As glândulas bulbo-

uretrais e próstata normalmente não apresentam alterações significativas (Santos et al., 2005). Curiosamente, vesiculite seminal e ampulite podem estar presentes em animais sem lesões microscópicas aparentes nos epidídimos (Foster et al., 1987).

Na ovelha, é importante ressaltar que outras espécies do gênero *Brucella* (*B. melitensis* e *B. abortus*) possuem maior potencial patogênico para a indução de aborto (Santos et al., 2005), a semelhança do que ocorre na infecção de vacas gestantes com *B. abortus* (Xavier et al., 2009a). Ainda assim, a infecção por *B. ovis* em animais gestantes pode resultar em placentite, mais acentuada nas regiões intercotiledonárias e caracterizada macroscopicamente por acúmulo de material amarelado fibrinoso sobre o córion intercotiledonário e espessamento da membrana cório-alantóide em decorrência de edema. (Molello et al., 1963; Osbourn e Kennedy, 1966). Lesões histológicas consistem de necrose de trofoblastos associada à presença do agente, infiltrado composto por neutrófilos e macrófagos e lesão vascular evidente (Osbourn e Kennedy, 1966).

Fetos abortados podem apresentar altos títulos de anticorpos anti-*B. ovis* (Osbourn e Kennedy, 1966). Por muitas vezes, os produtos de abortamento encontram-se autolizados, são pequenos para a sua idade gestacional e apresentam peritonite fibrinosa como única alteração macroscópica evidente (Osbourn e Kennedy, 1966; Santos et al., 2005). Lesões histológicas fetais incluem hiperplasia linfóide peribronquiolar, edema de septo alveolar e infiltrado inflamatório intersticial composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Osbourn e Kennedy, 1966; Burgess, 1982). Acúmulo discreto de neutrófilos nos espaços porta do fígado também pode ser observado em alguns casos (Osbourn e Kennedy, 1966; Libal e Kirkbride, 1983).

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*

A erradicação eficiente da infecção por *B. ovis* em rebanhos afetados depende da habilidade dos testes diagnósticos não só de identificar todos os animais infectados, como também de evitar o descarte desnecessário de carneiros saudáveis (West e Bruce, 1991). Watt (1972) afirma que não há um único método diagnóstico totalmente satisfatório. Portanto, o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* em carneiros deve ser realizado através de exame clínico associado a coletas sucessivas de amostras, sendo que estas devem ser submetidas concomitantemente a testes sorológicos e pesquisa direta do agente no sêmen de animais suspeitos (Lawrence, 1961).

Exame clínico

A realização de exame clínico da genitália externa de carneiros, com ênfase para a palpação escrotal, é considerada uma técnica válida para o diagnóstico de epididimite em ovinos (Watt, 1972). O exame é capaz de detectar alterações macroscópicas que afetam a fertilidade, possui baixo custo e o diagnóstico clínico pode ser informado imediatamente ao proprietário (Webb et al., 1980).

A palpação escrotal mostra-se ineficiente quando lesões crônicas sofrem regressão ao ponto de tornarem-se não detectáveis ao toque (Webb et al., 1980). Além disso, diversos estudos (Biberstein, 1964; Hughes e Claxton, 1968; Worthington et al., 1985; Plant et al., 1986) demonstram que animais sem alterações clínicas evidentes, são capazes de eliminar *B. ovis* no sêmen. Em ambos os casos, carneiros infectados seriam considerados clinicamente normais (Webb et al., 1980). A técnica ainda possui a desvantagem de não diferenciar a epididimite causada por *B. ovis* da epididimite em consequência de infecção

por diversos outros agentes bacterianos (Hughes e Claxton, 1968).

O exame de esfregaços de sêmen corados por técnicas como Giemsa para a evidenciação de células inflamatórias, particularmente neutrófilos, pode ser utilizado como um método auxiliar à palpação escrotal no diagnóstico da brucelose ovina (Burguess, 1982). Webb et al. (1980) demonstraram que a presença de células inflamatórias no sêmen pode ser considerada como o primeiro indicativo para a ocorrência de infecção, estando presente a partir de 2 semanas após a inoculação experimental. Porém, assim como o exame clínico, a presença de neutrófilos no sêmen não é específica de nenhum patógeno em particular (Webb et al., 1980; Burguess, 1982).

Métodos sorológicos

Ao contrário de outras espécies de *Brucella*, a *B. ovis*, assim como a *B. canis*, apresenta morfologia de colônia permanentemente rugosa, em consequência da ausência da cadeia O em seu lipolissacarídeo (LPS) de parede celular (Diaz et al., 1967). A maioria dos testes sorológicos convencionais para detecção de brucelose tem como alvo anticorpos produzidos contra a cadeia O de LPS. Portanto, estas provas sorológicas não são indicadas para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* (Alton et al., 1988).

Diversos métodos sorológicos podem ser utilizados para detectar anticorpos contra *B. ovis*. Alguns, porém, foram abandonados por apresentarem baixa sensibilidade e especificidade, ou por serem pouco práticos (Santos et al., 2005). Dentre as provas mais utilizadas, destacam-se a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Myers e Siniuk, 1970), fixação de complemento (FC) (Clapp, 1955; Alton, 1988) e ELISA indireta (Gall et al., 2003; Robles, 2008).

A fixação de complemento é considerada o teste sorológico padrão para o diagnóstico da brucelose ovina em programas de erradicação da doença na Austrália e Nova Zelândia (Burguess, 1982; Plant et al., 1986; West e Bruce, 1991). A detecção de animais soropositivos pode ocorrer a partir de duas semanas pós-inoculação e a maioria dos animais apresentam títulos positivos a partir de 4 a 5 semanas, com títulos máximos sendo atingidos às 9 semanas pós-inoculação (Biberstein et al., 1964; Webb et al., 1980).

O teste é considerado altamente específico, e sua especificidade está diretamente relacionada ao modo de extração do antígeno utilizado (Santos et al., 2005). Enquanto antígenos obtidos por ultra-som tiveram seu uso interrompido por apresentarem reação cruzada com outras espécies de *Brucella* (Diaz et al., 1967), antígenos solúveis obtidos por aquecimento e posterior centrifugação de suspensões salinas de *B. ovis* apresentaram resultados de especificidade satisfatórios (Myers e Siniuk, 1970).

Apesar de ser um teste amplamente utilizado em programas de erradicação, dificuldades consideráveis vem sendo relatadas no desenvolvimento e aplicação de um teste de FC satisfatório (Burguess, 1982). O método de diagnóstico possui desvantagens significativas relacionadas à sua complexidade de execução, necessidade de inativação do soro por calor, atividade anticomplementar de algumas amostras e à ocorrência de fenômeno de prozona (Blasco, 1990). Além disso, diversos autores demonstraram falhas deste teste diagnóstico em detectar animais infectados por *B. ovis*, principalmente em casos de infecção crônica (Hicks et al., 1978; Hughes, 1982; West e Bruce, 1991; West et al., 1993). Em consequência disso, testes diagnósticos alternativos passaram a ser desenvolvidos. Em decorrência de sua alta sensibilidade, simplicidade de execução e praticidade, o teste de imunodifusão em gel de ágar vem

sendo utilizado pra o diagnóstico de rotina da brucelose ovina por *B. ovis* no Brasil (MANUAL..., 2008). Os testes de IDGA usualmente utilizam antígenos de parede celular ou citoplasmáticos para a detecção de *B. ovis* (Blasco, 1990) e baseia-se na formação de complexo antígeno-anticorpo insolúvel que se precipita no gel, formando uma linha de precipitação visível após 72 horas de incubação (Myers e Siniuk, 1970).

Testes imunoenzimáticos (ELISA) também podem ser utilizados para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* (Vigliocco et al., 1997; Gall et al., 2003). O ELISA indireto vem sendo apontado como a prova mais sensível e específica para o diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis* (Worthington et al., 1984; Gall et al., 2003; Robles, 2008). Este teste possui a vantagem de apresentar uma leitura objetiva com o auxílio de um espectrofotômetro, utilização de quantidades mínimas de reagentes e soro, e o processamento de grande número de amostras ao mesmo tempo (Robles, 2008).

Comparações entre os testes de FC, IDGA e ELISA concluíram que o último apresenta melhores resultados individuais (Worthington et al., 1984; Marin et al., 1989; Blasco, 1990). Worthington e colaboradores (1984) demonstraram que o ELISA apresentou sensibilidade de 97,2%, enquanto os testes de IDGA e FC apresentaram sensibilidade de 96,3% e 91,7% respectivamente. Somente o teste de IDGA foi 100% específico. Resultados semelhantes foram obtidos por Marin e colaboradores (1989) com valores de sensibilidade de 97,6%, 96,4% e 92,7% para os testes de ELISA, IDGA e FC, respectivamente. Como alguns soros foram positivos no testes de IDGA e ELISA e negativos no teste de FC e vice-versa, os autores recomendam a utilização de pelo menos dois testes sorológicos no diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis*. A mesma recomendação é realizada por West e Bruce (1991) em programas de erradicação da

doença. Ainda, Ficapal e colaboradores (1998) observaram que há um aumento de 55,1% na sensibilidade do diagnóstico sorológico quando este era realizado simultaneamente pelas provas de IDGA e FC.

Isolamento bacteriano

O isolamento de *B. ovis* no sêmen de carneiros é considerado o diagnóstico definitivo da doença (Burguess, 1982). Este método diagnóstico possui grande valor, uma vez que outros agentes bacterianos podem causar lesões semelhantes àquelas apresentadas por animais infectados por *B. ovis* (Walker et al., 1986).

A identificação do microorganismo no sêmen é um indicador confiável da presença de infecção principalmente a partir de cinco semanas pós-inoculação (Webb et al., 1980), porém a ausência de detecção pode ser de significância questionável (Burguess, 1982). Tal fato se deve à eliminação do agente no sêmen ser intermitente (Laws et al., 1972; Webb et al., 1980; Worthington et al., 1985; West e Bruce, 1991) e, por muitas vezes, carneiros com alterações epididimárias e reação sorológica positiva não eliminarem o agente no sêmen (Burguess, 1982). Porém, diversos pesquisadores (Hicks et al., 1978; Hughes, 1982; West e Bruce, 1991) relatam identificação de animais infectados por *B. ovis* somente através de isolamento bacteriano, quando testes sorológicos foram incapazes de fazê-lo.

Para que a sensibilidade do isolamento bacteriano seja aumentada, três a quatro amostras de sêmen devem ser coletadas em intervalos semanais (Blasco, 1983). As amostras de sêmen devem ser plaqueadas em meio seletivo Thayer-Martin modificado que contém os antibióticos nitrofurantoína e o inibidor VCN (vancomicina, colistina, nistatina) (Brown et al., 1971), uma vez que a contaminação ambiental pode dificultar a identificação do agente (Hughes e Claxton,

1968; Blasco, 1990). O cultivo deve ser realizado em ambiente com 5 a 10% de CO₂ a 37° C e a leitura das placas realizadas após 5 a 7 dias de incubação. As colônias de *B. ovis* são pequenas, de bordos regulares e coloração variando de branca a amarronzada (Alton et al., 1988). Em provas bioquímicas confirmatórias, *B. ovis* é urease negativa, não redutora de nitrato a nitrito, catalase positiva e oxidase negativa, não produtora de H₂S e geralmente cresce em concentrações-padrão de tionina e fucsina (Blasco, 1990).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O “padrão-ouro” para o diagnóstico definitivo de animais suspeitos de brucelose continua a ser o isolamento bacteriano de tecidos do hospedeiro, leite e fluidos corporais, seguido de caracterização bacteriológica por provas bioquímicas (Alton et al., 1988). Porém, o processo de identificação bacteriológico pode demorar períodos superiores a duas semanas, são complexos e requerem que o microorganismos esteja viável para que haja crescimento em cultivo (Bricker, 2002). Testes moleculares baseados em PCR podem ser considerados uma alternativa para os entraves apresentados pelo isolamento bacteriano, uma vez que têm demonstrado ser mais rápidos e mais sensíveis que os métodos tradicionais de diagnóstico (Bricker, 2002).

A técnica de PCR baseia-se na amplificação de seqüências específicas de DNA presentes no genoma de um determinado ser vivo. Como o gênero *Brucella* possui o genoma amplamente conservado entre as espécies (Halling et al., 2005), a maioria das PCRs desenvolvidas são gênero-específicas, ou seja, amplificam seqüências de DNA comuns às diferentes espécies de *Brucella*. Fekete e colaboradores (1990) relataram o primeiro ensaio de diagnóstico baseado em PCR para o gênero *Brucella*, resultante da amplificação de um seguimento de 635pb do

gene que codifica a proteína de membrana externa de 43-kDa de *Brucella abortus* S19. Dois anos depois, Hernan e De Ridder (1992) exploraram o gene 16S rRNA para o desenvolvimento de uma PCR baseada na amplificação de um produto de 800 pb conservado nas espécies clássicas do gênero. Outros autores utilizaram o mesmo gene para amplificação de outras seqüências-alvo de PCR (Romero et al., 1995; Rijpens et al., 1996). A seqüência de genes que codificam a proteína de superfície da *Brucella* de 31kDa (bscp31) também foi alvo de estudo por Baily e colaboradores (1992). Costa et al. (1996) testaram as espécies clássicas de *Brucella* mediante a amplificação de fragmentos de 223pb do gene bscp31 e demonstraram que todas as espécies do gênero poderiam ser reconhecidas, sem distinção entre elas. Desde então, o método de diagnóstico baseado em PCR vem sendo amplamente utilizado para a detecção de *Brucella* em diferentes amostras biológicas como sangue, leite, sêmen e órgãos de animais suspeitos (Romero e Lopez-Goni, 1999; Cortez et al., 2001; Manterola et al., 2003; O’Leary et al., 2006; Saunders et al., 2007).

Bricker e Halling (1994) desenvolveram uma PCR baseada na amplificação do elemento de inserção 711 (IS711 ou IS6501) presente em múltiplas cópias no genoma de todas as espécies clássicas de *Brucella*. A suposta alta sensibilidade de uma PCR em que há várias cópias do alvo de amplificação no genoma do organismo-alvo, levou Manterola et al. (2003) a desenvolverem o primeiro teste diagnóstico baseado em PCR para amostras biológicas de carneiros infectados por *B. ovis*. Neste estudo, 50% (26/52) de amostras de animais com evidência sorológica de infecção por *B. ovis* foram positivas para bacteriologia e, dentre estas amostras positivas, 84,6% (22/26) também foram positivas por PCR. Além disso, houve 0,91 de concordância entre os resultados de isolamento e PCR. Os autores concluíram que a técnica de PCR

desenvolvida poderia ser utilizada como diagnóstico auxiliar da infecção por *B. ovis*.

Saunders et al. (2007) desenvolveram uma técnica de PCR multiplex utilizando as mesmas seqüências-alvo descritas por Manterola et al. (2003), com o objetivo de detectar a presença de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* em amostras de sêmen ovino fresco e provenientes de centrais de inseminação. A PCR desenvolvida foi igualmente capaz de detectar a presença de *B. ovis* em sêmen infectado quando comparada à bacteriologia, ambas apresentando três amostras positivas entre 295 disponíveis. Além disso, a técnica mostrou-se superior à bacteriologia na identificação de amostras infectadas por *A. seminis* e *H. somni*, sendo também considerada pelos autores como uma ferramenta válida para o diagnóstico destas três enfermidades.

A técnica de PCR ainda possui aplicação importante quando a identificação da espécie de *Brucella* torna-se necessária, como em estudos epidemiológicos e programas de erradicação (Bricker, 2002). Porém, métodos de PCR denominados diferenciais, ou seja, capazes de distinguir as diferentes espécies de *Brucella*, são essencialmente mais complexos e difíceis de serem realizados (Bricker, 2002). Dentre as diversas técnicas disponíveis, destaca-se o AbortusMelitensisOvisSuis (AMOS) PCR, capaz de diferenciar *B. abortus* biovars 1, 2 e 4; *B. melitensis*; *B. ovis* e *B. suis* biovar 1. O princípio da técnica baseia-se no fato de que, apesar do número de cópias e a localização do elemento de inserção IS771 ser tipicamente conservados nas espécies de *Brucella*, a maioria das espécies possui pelo menos uma cópia deste elemento em localização única em seu cromossomo (Bricker e Halling, 1994). A diferenciação de espécies de *Brucella* também pode ser realizada através da técnica de PCR-RLFP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) descrita por Cloeckert e colaboradores

(1996), baseada em polimorfismos presentes nas seqüências dos genes *omp2A* e *omp2B* que codificam proteínas externas de membrana em todas as espécies clássicas do gênero.

Além do PCR denominado convencional, diversos autores vêm desenvolvendo o diagnóstico da infecção por *Brucella* através da técnica de PCR em tempo real (Bounaadja et al., 2009). Os métodos usualmente utilizam como alvo, as seqüências genéticas conservadas entre as espécies, como IS711 e o gene *bcs31* (Debeaumont et al., 2005; Navarro et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007; Bounaadja et al., 2009). O PCR em tempo real possui as vantagens de execução mais rápida e fácil, limitar a possibilidade de contaminação do DNA utilizado e permitir a quantificação dos produtos de DNA avaliados (Bounaadja et al., 2009).

CONTROLE DA INFECÇÃO POR BRUCELLA OVIS

Em países onde há alta prevalência da doença, programas de controle baseados em vacinação, seguidos de teste e sacrifício de animais positivos revelaram ser práticos e econômicos (Santos et al., 2005). Em países onde a prevalência da brucelose ovina é baixa, programas de erradicação baseados em associação de testes sorológicos e bacteriológicos seguidos de sacrifício realizados em intervalos de semestrais ou anuais também revelaram ser eficientes (Clapp et al., 1962; Burgess, 1982; West e Bruce, 1991).

Buddle (1954) desenvolveu uma vacina baseada em bacterina de *B. ovis* preparada em emulsão salina em óleo, cuja imunogenicidade foi melhorada pela adição de *B. abortus* S19 (Buddle, 1958). Reações adversas à vacina incluíram excreção da amostras S19 no sêmen dos carneiros imunizados (Hughes e Claxton, 1968), ocorrência de epididimite e interferência

com o diagnóstico sorológico (Blasco, 1990).

A utilização de vacinas preparadas a partir da amostra atenuada de *B. melitensis* REV 1 conferiu imunidade em mais de 80% dos animais vacinados (Marin et al., 1990). Esta vacina tem sido amplamente utilizada em países onde há infecção tanto por *B. ovis* quanto *B. melitensis* (Santos et al., 2005). Entretanto, a vacina baseada na amostra REV 1 não possui aceitação em países, como o Brasil, onde a *B. melitensis* é exótica, uma vez que há interferência com resultados sorológicos e esta amostra pode ser patogênica para o homem (Burguess, 1982).

Até o presente momento não há tratamento efetivo pra a enfermidade e, apesar da ocorrência de regressão de lesões macroscópicas dos animais afetados, a fertilidade do rebanho infectado por *B. ovis* fica permanentemente comprometida. Portanto, o conhecimento da epidemiologia desta doença, a identificação e eliminação de carneiros positivos nos diferentes testes diagnósticos e/ou com lesões genitais deve ser a base para impedir a perpetuação da brucelose ovina em um rebanho (Clementino et al., 2007).

CAPITULO II

Desenvolvimento e avaliação de método de PCR espécie-específico para diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* em amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de carneiros

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da brucelose ovina é realizado através de uma associação entre exame clínico, provas sorológicas e isolamento bacteriano em amostras de sêmen de animais infectados (Webb et al., 1980; Burgess, 1982). A associação de provas é necessária, uma vez que um só método de diagnóstico não é considerado eficiente para a identificação de todos os animais acometidos (Lawrence, 1961; Watt, 1972). Diante de falhas apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais (Hicks et al., 1978; Burgess, 1982; Hughes, 1982; West e Bruce, 1991), métodos moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) baseados em amplificação de fragmentos de DNA de *B. ovis* em amostras de sêmen de animais infectados foram propostos por alguns autores (Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007). Contudo, os métodos de PCR disponíveis atualmente, utilizam seqüências-alvo conservadas entre as diferentes espécies do gênero *Brucella* (Manterola et al., 2003; Saunders et al., 2007). Portanto, até o presente momento, não há uma técnica de PCR espécie-específica para *B. ovis*.

A ausência de diferenciação entre espécies de *Brucella* pode ser tornar um problema de saúde pública, uma vez que ovinos são os hospedeiros não só de *B. ovis*, como também de *B. melitensis* (Blasco, 1990). Enquanto *B. ovis* é, aparentemente, não-virulenta para humanos, *B. melitensis*, espécie exótica no Brasil, é considerada a espécie com maior potencial zoonótico, podendo inclusive ser utilizada como arma biológica. Em

consequência, a diferenciação da infecção entre estes dois agentes torna-se necessária para o estabelecimento de um programa de controle eficiente e para monitoramento de agentes zoonóticos em países livres, ou mesmo naqueles em que a brucelose humana por *B. melitensis* está presente.

Tsolis e colaboradores (2009) realizaram o sequenciamento completo do genoma da amostra de referência ATCC25840 de *B. ovis* (também conhecida como 63/290 ou NCTC10512), isolada originalmente na Austrália (Buddle, 1956). Este trabalho resultou na identificação de um segmento do cromossomo II, contendo 28 janelas abertas de leitura (ORF, do inglês: *open reading frame*) ausentes nas demais espécies de *Brucella* já seqüenciadas, que incluem *B. melitensis* (Delvechio et al., 2002), *B. suis* (Paulsen et al., 2002) e as amostras 9-941, 2308 e amostra vacinal B19 de *B. abortus* (Halling et al., 2005; Chain et al., 2005; Crasta et al., 2008).

Considerando o potencial destas ORF como alvos para amplificação no desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos para *B. ovis*, a ausência de um método de PCR espécie-específico para a identificação da infecção por *B. ovis*, e a necessidade de um teste diagnóstico prático e eficiente para a brucelose ovina, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método diagnóstico espécie-específico baseado em PCR para amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de carneiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Especificidade dos inicializadores e sensibilidade analítica

Para a determinação da especificidade dos inicializadores utilizados em relação a outras espécies clássicas do gênero *Brucella*, foram obtidas amostras de referência de *B. melitensis* (amostra 16M), *B. abortus* (amostra 2308), *B. suis* (amostra 1330), *B. canis* e *B. neotomae*. Para a verificação de que as seqüências genéticas estudadas eram conservadas entre diferentes isolados de *B. ovis*, 18 isolados deste agente provenientes de diferentes partes do mundo foram utilizados. Para a determinação de especificidade dos inicializadores em relação a outros agentes infecciosos, foram obtidas cepas de diferentes espécies de bactéria causadoras de epididimite em ovinos: *Actinobacillus seminis* (ATCC15768), *Histophilus somni* (3384Y and D0614057), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (D0507204 e D0503218), *Arcanobacterium pyogenes* (D0602705 e D06022438), *Mannheimia haemolytica* (D0614057) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) assim como espécies filogeneticamente relacionadas à *B. ovis*: *Ochrobactrum intermedium* (LM3301) and *Ochrobactrum antropi*. As amostras foram submetidas à extração de DNA e posterior reação de PCR utilizando os parâmetros descritos posteriormente.

A sensibilidade analítica foi avaliada a partir da obtenção de colônias *B. ovis* cepa ATCC25840 cultivadas por 5 dias em meio GC (DIFCO, EUA) acrescido de hemoglobina bovina a 1% (BBL, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Uma suspensão concentrada de *B. ovis* foi preparada em solução salina PBS estéril contendo aproximadamente 1 x 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônia)/mL com o auxílio de um espectrofotômetro (SmartSpec, BioRad). Foram realizadas diluições decimais em base 10, a partir da

suspensão inicial, com o objetivo de obter novas suspensões contendo concentrações entre 10⁷ e 10¹ UFC/mL de *B. ovis*. Todas as concentrações de *B. ovis* foram confirmadas por plaqueamento de 100 µL das suspensões nas diluições 10⁻⁴, 10⁻³ e 10⁻² em meio GC (DIFCO, EUA) acrescido de hemoglobina bovina (BBL, EUA) e contagem das colônias após 5 dias de incubação. Amostras frescas de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de ovinos machos sabidamente negativos para *B. ovis*, provenientes de rebanho com 100% de sorologia negativa no rebanho sem histórico de epididimite ou infertilidade, foram obtidas em condições assépticas para a realização do experimento. A contaminação das amostras foi realizada a partir da inoculação de 100 µL das suspensões de *B. ovis* com concentração variando entre 10⁷ e 10¹ UFC/mL em 900 µL de sêmen, sangue, urina ou lavado prepucial, de forma que fossem obtidas amostras finais contendo entre 10⁶ e 10⁰ UFC/mL de *B. ovis*. As amostras foram submetidas à extração de DNA e reação de PCR, conforme descrito abaixo.

Animais experimentais e coleta de amostras

Foram utilizados nove carneiros mestiços da raça Santa Inês, com um a três anos de idade, mantidos na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em piquete único e isolado de outros animais. Foram utilizadas duas fêmeas mestiças da raça Santa Inês para auxílio na coleta de amostras de sêmen. Durante a fase de adaptação, os animais foram condicionados à coleta de sêmen através da utilização de vagina artificial. Para isso, os machos foram colocados em contato diário com as fêmeas, permitindo a monta e coleta de sêmen, por aproximadamente 15 dias. Para que houvesse interesse inicial dos machos, estro artificial foi induzido alternadamente nas fêmeas utilizadas através da aplicação de 1 mL de cipionato de estradiol (ECP - Pfizer Saúde Animal, Brasil) 48h antes da coleta de

sêmen. Este protocolo continuou sendo utilizado durante o período experimental, quando necessário. Durante a fase de adaptação e no período experimental, os animais foram alimentados com feno e ração comercial para ovinos e submetidos à vermifugação (Cidectin injetável, Fort Dodge Animal Health, Brasil) sempre que necessário, com base na contagem de ovos nas fezes. Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA, protocolo: 02/2007)

Após o período de adaptação, os animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *B. ovis* cepa ATCC25840 por via intraprepucial e com 50 μ L em ambos os sacos conjuntivais de solução contendo $1,2 \times 10^{10}$ UFC da mesma cepa. As inoculações prepucial e conjuntival foram realizadas simultaneamente (Blasco, 1990), de forma que cada animal recebeu o desafio total de $3,6 \times 10^9$ UFC de *B. ovis*.

Antes da inoculação, todos os carneiros foram submetidos à coleta de soro, sangue, sêmen, urina e lavado prepucial com o objetivo de confirmar a ausência de infecção pré-inoculação. Após a inoculação, os animais foram submetidos a coletas quinzenais, por 180 dias, de amostras de soro para exame sorológico de IDGA e amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial para realização de isolamento bacteriano e reação de PCR. Para que a coleta fosse realizada da maneira mais asséptica possível, foram utilizados somente equipamentos previamente esterilizados e, antes da coleta, a região prepucial de cada animal foi limpa com solução de álcool etílico a 70% e papel toalha. As amostras de sêmen foram obtidas através de monta natural com auxílio de vagina artificial, com exceção do carneiro 9, para o qual foi necessária a utilização de eletroejaculador (Biberstein et al., 1964). As amostras de urina foram colhidas por meio de bloqueio da respiração do animal por 30 segundos a

um minuto, o que estimulou a micção espontânea do carneiro (Nozaki, 2008). As amostras de lavado prepucial foram colhidas pela introdução de 10 mL de PBS estéril na bainha prepucial do animal com auxílio de um tubo plástico estéril (equipo utilizado para hidratação parenteral), seguida de massagem por um minuto e recuperação do líquido com o auxílio de uma seringa (Clark e Dufty, 1978).

Para que fosse realizada a pesquisa do agente nos órgãos dos animais, aos 192 dias pós-infecção, estes foram sedados com xilazina (Copazine, Schering-Plough Coopers, Brasil), eutanasiados por eletrocussão e submetidos à necropsia. Foram colhidos fragmentos de cauda, corpo e cabeça de ambos os epidídimos, ambos os testículos, ampola do ducto deferente, vesículas seminais, glândulas bulbo-uretrais, prepúcio, glândula, linfonodos inguinais, linfonodos ilíaco-internos, baço, fígado, rins e bexiga. Amostras de todos estes órgãos foram colocadas em tubos tipo Falcon de 50 mL estéreis, contendo 2 mL de PBS estéril para isolamento bacteriano e congeladas a -80° C para posterior extração de DNA.

Como controle negativo foram utilizados oito carneiros machos da raça Santa Inês com idade entre 1 e 4 anos provenientes de propriedade da região metropolitana de Belo Horizonte livre de *B. ovis* e sem histórico de epididimite ou infertilidade. A propriedade foi determinada como livre pela da coleta de soro de 10% do rebanho (aproximadamente 30 animais), incluindo todas as faixas etárias de animais, e realização de teste sorológico de IDGA, no qual todos os animais foram negativos. Os oito carneiros foram submetidos a coletas semanais, por 4 semanas, de amostras de soro, sangue, sêmen, urina e lavado prepucial, como descrito para os animais experimentalmente infectados.

Amostras de sêmen liofilizado de quarenta animais, provenientes de rebanhos

naturalmente infectados, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Robles, no Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) – Bariloche, Argentina. Os animais apresentaram diferentes perfis sorológicos (realizado por método de ELISA indireto) e de isolamento bacteriano para *B. ovis* (Anexo A4). Para realização da extração de DNA e PCR, as amostras de sêmen foram ressuspensas em 1 mL de PBS estéril.

Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Para a realização da IDGA, utilizou-se agarose (Invitrogen, Brasil) a 1,1% em tampão borato 0,1 M pH 8,6, perfurador hexagonal com sete orifícios (um central e seis periféricos) medindo 4 mm de diâmetro, com distância entre orifícios de 3mm e com capacidade para 30 µL de soro/antígeno por orifício. Os orifícios 1 e 4 foram preenchidos com soro controle¹; orifícios 2, 3, 5 e 6 com os soros testes e orifício central, com o antígeno. O antígeno utilizado foi produzido pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF e composto por extrato solúvel obtido a partir de cultivo fresco de *B. ovis*, amostra REO 198, inativada pelo calor, IPVDF®. Sobre uma superfície nivelada, foram distribuídos 4,6 mL de agarose por lâmina de vidro (25 x 75 mm) desengordurada previamente em solução álcool-éter 50%. Após ocorrência de gelificação, as lâminas foram acondicionadas em câmara umedecida por 30 minutos a 4°C para estabilização iônica. Foram perfuradas 3 rosetas por lâmina, e a retirada dos orifícios foi realizada com auxílio de uma agulha fina. Após a distribuição dos reagentes, as lâminas foram colocadas em câmara úmida à temperatura ambiente e a leitura realizada após 72h de incubação, em luz direta, sobre fundo escuro. Para a leitura, primeiramente foram observadas as linhas do soro controle positivo (1 e 4), e em seguida as linhas dos soros testes, verificando a ocorrência de linhas de precipitação com identidade com aquelas do soro controle.

¹ Gentilmente cedido pelo Dr. Maurício Dasso, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Porto Alegre, RS

Isolamento bacteriano

Para o isolamento de *B. ovis*, 100 µL das amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial foram semeados em placas contendo meio Thayer-Martin modificado, composto por meio GC (DIFCO, EUA), 1 % de hemoglobina bovina (BBL, EUA) e inibidor VCN (BBL, EUA) (Brown et al., 1971; Alton et al., 1988). As amostras de órgãos foram primeiramente pesadas e então maceradas com auxílio de um homogeneizador (Hamilton, Brasil), para então serem plaqueadas da mesma maneira que as demais amostras. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, e a leitura das mesmas realizada após 5 a 7 dias de incubação (Alton et al., 1988). As colônias suspeitas foram identificadas através da técnica de PCR espécie-específica descrita neste trabalho. As colônias foram repicadas em placas contendo meio GC (DIFCO, EUA) com 1% de hemoglobina bovina (BBL EUA) e, após 5 dias de incubação, as massas de bactéria foram ressuspensas em 100 µL de água deionizada estéril, submetidas à fervura por 10 minutos e centrifugadas a 10.000xg por 1 minuto. Então, 2 µL do sobrenadante obtido foram utilizados para realização da PCR.

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de bactéria utilizadas para a avaliação de especificidade dos inicializadores foi realizada ressuspendendo a cultura em 567 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0), seguida de adição de tampão de extração contendo 30 µL de sódio duodecil sulfato (SDS) 10% (Bioagency, Brasil) e 3 µL de proteinase K (20mg/mL) (Invitrogen, Brasil) e incubação a 55°C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e, após agitação, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl, seguido de uma segunda incubação a 65 °C por 10 minutos. O restante do processo foi

realizado pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isopropílico.

O DNA das amostras de sêmen e sangue total foi extraído imediatamente após a coleta do material. Aproximadamente 500 µL de sêmen ou PL foram adicionados a 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM de EDTA pH 8,0) e centrifugadas a 13.000xg por 5 minutos por uma a três vezes, até que o sobrenadante ficasse translúcido. Então, as amostras foram ressuspendidas em um segundo tampão Tris-EDTA (TE-2) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl) e submetidas a incubação a 80°C por 10 minutos em termobloco. Após incubação, foram adicionados 50 µL de SDS a 10% e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen, Brasil), seguidos de nova incubação a 37°C por 24h. Após a segunda incubação, foram adicionados 500 µL de fenol (GE Healthcare, Brasil) seguido de centrifugação das amostras a 13.000xg por 5 minutos. Então, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL, seguido por adição de 400 µL de fenol-clorofórmio (GE Healthcare, Brasil). As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 13.000xg por 5 minutos, seguida de transferência de 300 µL da fase aquosa para um novo microtubo de 1,5 mL e adição de 300 µL de álcool isopropílico. Em seguida, as amostras foram mantidas a -20°C *overnight* seguida de centrifugação a 13.000xg por 30 minutos para precipitação do DNA. A lavagem do *pellet* de DNA formado foi realizada pela adição de 1000 µL de etanol a 70% seguida de centrifugação a 13.000xg por 20 minutos (Matrone et al., 2009). O *pellet* final foi ressuspendido em 30 µL de tampão TE estéril e incubado a 56°C por 15 minutos. O material foi estocado a -20°C até a realização da PCR.

As amostras de urina e lavado prepucial foram congeladas a -20°C até a extração.

Para extração, 1 mL das amostras foi descongelado e adicionado a 500 µL de tampão TE pH 8,0 e centrifugadas a 13.000xg por 15 minutos. O restante do procedimento de extração foi o mesmo utilizado para as amostras de sêmen e sangue.

Para a extração de DNA, fragmentos de órgãos foram descongelados, macerados com auxílio de lâmina de bisturi estéril, adicionados a 800 µL de tampão TE pH 8,0 e centrifugadas a 13.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as lavagens repetidas por 3 a 4 vezes até que o sobrenadante ficasse límpido. O restante do procedimento de extração foi o mesmo utilizado para as amostras de sêmen e sangue, com exceção da ressuspensão do *pellet* final, realizada em 200 µL de tampão TE estéril.

Após a extração, a pureza e concentração de DNA de todas as amostras foram estimadas por espectrofotometria, medindo-se a densidade óptica a 260 nm para DNA e a 280 nm para proteínas.

PCR

O processo de amplificação utilizado foi o mesmo para as amostras de colônias de bactérias, sêmen, sangue, urina, lavado prepucial e órgãos. Os 12 pares de inicializadores utilizados para os experimentos iniciais de especificidade estão listados na Tabela 1. Para os experimentos adicionais em amostras biológicas, foram selecionados os inicializadores AO503 e AO512 de acordo com a sua maior sensibilidade aparente e ausência de reações inespecíficas quando a amplificação do DNA bacteriano foi realizada em amostras contendo DNA de mamífero (DNA ovino).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 23 µL de mix de PCR comercial (Supermix, Invitrogen, Brasil), 0,5 µL de cada

inicializador a 25 mM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e entre 100 e 500 ng por reação do DNA extraído. Água MilliQ estéril foi utilizada como controle negativo e DNA de colônia pura de *B. ovis* extraído por método de fervura descrito anteriormente foi utilizado como controle positivo.

Os parâmetros de amplificação utilizados foram os seguintes: 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto (todos os iniciadores foram delineados para temperatura ótima de anelamento de aproximadamente 57°C) e 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

A análise do produto amplificado foi realizada em gel de agarose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 1% em cuba horizontal com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0) 1X. As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular e foram consideradas positivas aquelas com peso molecular esperado para cada primer utilizado.

Análise estatística

A análise de frequência de amplificação das ORFs pelo método de PCR e isolamento bacteriano foi avaliada pelo teste exato de Fisher com auxílio do programa GraphPad InStat software versão 3.05 (GraphPad InsStat software, Inc. San Diego, CA, EUA), considerando-se diferenças significativas quando o $P < 0,05$. A sensibilidade e especificidade do teste de PCR foram calculados segundo Henken et al. (1997), utilizando o programa GraphPad InStat software versão 3.05 (GraphPad InsStat software, Inc. San Diego, CA, EUA). A comparação entre os testes diagnósticos foi realizada pela estatística kappa (Smith, 1994), utilizando o programa Minitab 15 (Global Tech, Belo Horizonte, MG, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada amplificação de produtos de PCR específicos pelos 12 inicializadores delineados, utilizando amostras de DNA de espécies clássicas de do gênero *Brucella* (Figura 1), de outras espécies de bactéria causadoras de epididimite em ovinos ou amostras de DNA de microorganismos filogeneticamente relacionados à *B. ovis* (Tabela 2). Além disso, houve amplificação específica de produtos de PCR quando as 18 amostras distintas de *B. ovis* foram utilizadas (Figura 2). Estes resultados demonstram a alta especificidade dos inicializadores utilizados neste trabalho.

A sensibilidade analítica encontrada utilizando-se os inicializadores ORF AO503 e ORF AO512 foi de 10^2 , 10^1 e 10^0 UFC/mL para amostras de sêmen e sangue, urina e lavado prepucial, respectivamente (Tabela 3 e Figura 3). A alta sensibilidade encontrada em amostras de lavado é esperada, uma vez que não há grande número de células e, conseqüentemente, a presença possíveis inibidores de PCR neste tipo de amostra é restrito. A sensibilidade analítica encontrada neste estudo é semelhante àquela encontrada por outros autores, como Nozaki (2008) que, utilizando inicializadores descritos por Manterola e colaboradores (2003) obteve sensibilidade de 10^2 UFC/mL em amostras de sêmen e urina artificialmente inoculadas com *B. ovis*. Já Saunders e colaboradores (2007) descrevem sensibilidade de aproximadamente 2×10^1 UFC/mL em amostras de sêmen infectadas com *B. ovis*, aplicando técnica de PCR multiplex. Amim e colaboradores (2001) relataram sensibilidade de 10^2 UFC/mL utilizando inicializadores específicos para detecção de *B. melitensis* em amostras de sêmen ovino e bovino. Já Kim e colaboradores (2006) relataram uma sensibilidade mais baixa de técnica de PCR empregada para detecção de DNA de *B. canis* em amostras de sêmen. Neste estudo (Kim et al., 2006), a técnica foi somente capaz de detectar 10^3 UFC/mL.

Tabela 1. Sequências dos inicializadores específicos para *B. ovis* utilizados neste estudo.

Janela aberta de leitura (ORF)	Inicializadores	Produto
A0492	S: 5'-TTGAGACCGCTATCGTTGAGGG-3' AS: 5'-GTCCTTGTGGTAGATGGGCAGTAG-3'	278 pb
A0495	S: 5'-CAGGATTATGTGCTCAACGATGC-3' AS: 5'-CAGGTGCTCCAGAAACGATACC-3'	135 pb
A0496	S: 5'-TGGCTATTACGACGACACTGGAAG-3' AS: 5'-AAGCATCACAAAGCGGGTTCGG-3'	278 pb
A0497	S: 5'-TCATTACCAAGAACGGTCGCC-3' AS: 5'-CGCAAGATCGTCTTCTGTCAGC-3'	119 pb
A0500	S: 5'-TGGTATCTTCAGCCGTTCCAAG-3' AS: 5'-ATCTTTGCCCGTTCCAGTCG-3'	225 pb
A0502	S: 5'-TGATAAATGCTGAACTGCCGC-3' AS: 5'-CGCCGAAATACCAAAACAGAGG-3'	167 pb
A0503	S: 5'-GCCTACGCTGAAACTTGCTTTTG-3' AS: 5'-ATCCCCCATCACCATAACCGAAG-3'	228 pb
A0504	S: 5'-TGATTGGGACGCAGACCAGAAC-3' AS: 5'-CGGGTGTAACTCCAGATTATGTCG-3'	159 pb
A0505	S: 5'-ACCAAACCAAACCTTGATGTCGG-3' AS: 5'-GCATTTTCGGCAACCATTCC-3'	220 pb
A0506	S: 5'-GCACCAAATATGCGGAAGATCC-3' AS: 5'-TTCGATCATCGTCTGGCTCG-3'	140 pb
A0511	S: 5'-ATGCGGCGACCAATGAACTG-3' AS: 5'-TGATGCGTTGAGGGCAATCC-3'	197 pb
A0512	S: 5'-TTCAGGCGACTGCTAATGGCAC-3' AS: 5'-AAACCGATACCTCATCCCCGAG-3'	135 pb
BR0615	S: 5'-AGTCCGAGCCTATAAGC-3' AS: 5'-AGGCTGTAGATTGCAATC-3'	631 pb

S: sequência senso; AS: sequência anti-senso

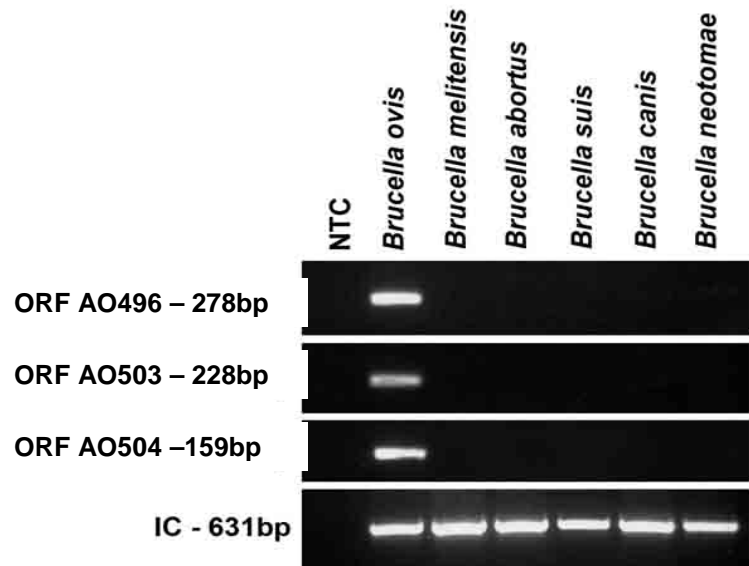


Figura 1. Resultado representativo (ORFs AO496, AO503 e AO504) da amplificação das seqüências das 12 ORF nas seis espécies clássicas do gênero *Brucella*. NTC: controle negativo, sem adição de DNA genômico à reação; IC: controle interno – reação de PCR com iniciadores para gene BR0615, gene sabidamente conservado em todas as espécies do gênero *Brucella*.



Figura 2. Resultados representativos (ORF AO496) de amplificação das 12 ORF utilizando 18 isolados de campo de *B. ovis*. NTC: controle negativo, sem adição de DNA genômico à reação.

Tabela 2. Resultados de amplificação de 12 produtos específicos de PCR utilizando DNA de diferentes bactérias causadoras de epididimite em ovinos ou filogeneticamente relacionados à *Brucella ovis*.

Bactéria	Janela aberta de leitura (ORF)											
	AO492	AO495	AO496	AO497	AO500	AO502	AO503	AO504	AO505	AO506	AO511	AO512
<i>Actinobacillus seminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinobacillus pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlamydophila abortus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Histophilus somni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum. intermedium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum. antropi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella ovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo; - : negativo

Aparentemente, o número de seqüências-alvo, múltiplo nas técnicas utilizadas por Manterola e colaboradores (2003) e único no presente trabalho, não influenciou a sensibilidade analítica do método de PCR, que pode estar limitada por fatores de inibição presentes, principalmente, nas amostras de sêmen e sangue.

O desafio utilizado na infecção experimental foi suficiente para resultar em infecção em todos os animais inoculados ao longo dos 180 dias de experimento (Anexo B). Os resultados sorológicos (Figura 4) demonstram que a detecção de anticorpos contra *B. ovis* pelo do teste de IDGA foi iniciada aos 15 dias pós-inoculação e que esta foi instável durante todo o período

experimental. Houve maior porcentagem de detecção, 88,9% (8/9) dos animais, na fase aguda da infecção entre 30 e 60 dias pós-inoculação. Os resultados aqui apresentados são semelhantes àqueles descritos por outros pesquisadores que, após realizarem inoculação experimental com *B. ovis* por via intraprepucial, verificaram o desenvolvimento de títulos detectáveis em provas sorológicas entre 2 e 9 semanas pós-inoculação, e que, após este período, os títulos tornavam-se flutuantes entre os animais (Webb et al., 1980; Burgess, 1982; Plant et al., 1986). O mesmo resultado foi observado por Nozaki (2008) utilizando a prova de IDGA em carneiros experimentalmente infectados.

ORF AO 503

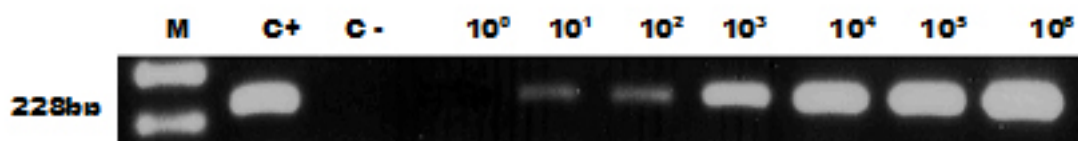


Figura 3. Resultados representativos (ORF AO503) de sensibilidade analítica utilizando amostras de urina de carneiro livre de *Brucella ovis* artificialmente inoculada com concentrações variando de 10^0 a 10^6 UFC/mL. M: marcador de peso molecular; C+: controle positivo, DNA puro de cultura de *B. ovis*; C-: controle negativo, sem DNA genômico na reação.

Tabela 3. Resultados de sensibilidade analítica utilizando amostras de sêmen, sangue, urina e lavado prepucial de carneiro livre de *Brucella ovis* artificialmente inoculadas com concentrações variando de 10^0 a 10^6 UFC/mL.

Amostra	Concentração de <i>Brucella ovis</i> (UFC/mL)						
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Sêmen	-	-	+	+	+	+	+
Sangue	-	-	+	+	+	+	+
Urina	-	+	+	+	+	+	+
Lavado Prepucial	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo; - : negativo

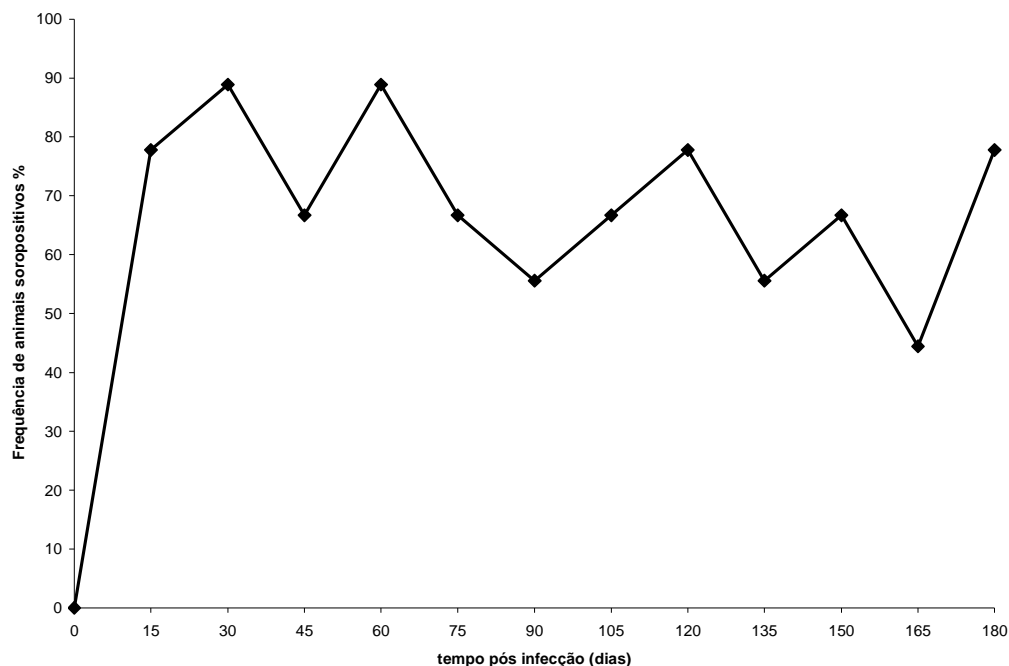


Figura 4. Frequência de animais positivos para *B. ovis* em teste sorológico de IDGA ao longo de 180 dias, após infecção experimental.

A eliminação da *B. ovis* em amostras de sêmen, detectada tanto por PCR quanto por bacteriologia, ocorreu a partir de 45 dias pós-infecção em um animal e se manteve intermitente ao longo da infecção (Figura 5). O mesmo padrão foi observado para as amostras de urina e lavado prepucial (Figuras 6 e 7, respectivamente), sendo que foi possível detectar o agente na urina de um animal aos 30 dias pós-inoculação. A eliminação intermitente do agente em amostras de sêmen foi descrita por diversos autores (Burguess, 1982; Worthington, 1984; Plant, 1986; Manterola et al., 2003; Nozaki, 2008). Aparentemente, o padrão é o mesmo para outras amostras biológicas dos animais infectados. Quando os resultados das três amostras biológicas foram considerados conjuntamente, o percentual de animais positivos tanto por isolamento quanto por PCR aumentou, chegando a

77,8% (7/9) de animais positivos por PCR aos 135 dias pós-inoculação (Figura 8). Portanto, além de coletas seriadas de amostras, o diagnóstico da brucelose ovina pode ser melhorado através da coleta de mais de uma amostra biológica, como sêmen e urina, de animais suspeitos.

A *B. ovis* não foi detectada por PCR ou bacteriologia em amostras de sangue ao longo da infecção. Biberstein et al. (1964) descreve a ocorrência de fase bacterêmica da doença por volta de 60 dias pós-inoculação. Caso esta fase tenha ocorrido neste estudo, a quantidade de bactéria circulante foi inferior ao limite de detecção das técnicas aplicadas. Em consequência, amostras de sangue não são indicadas para o diagnóstico direto de *B. ovis* em ovinos.

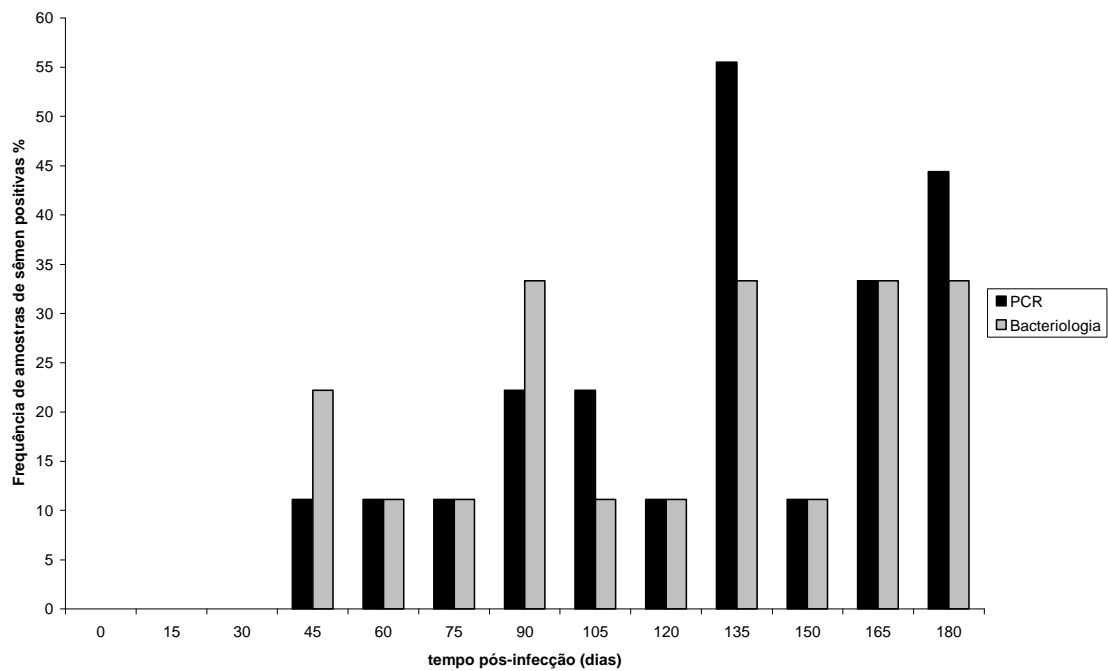


Figura 5. Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de sêmen ao longo de 180 dias de infecção experimental.

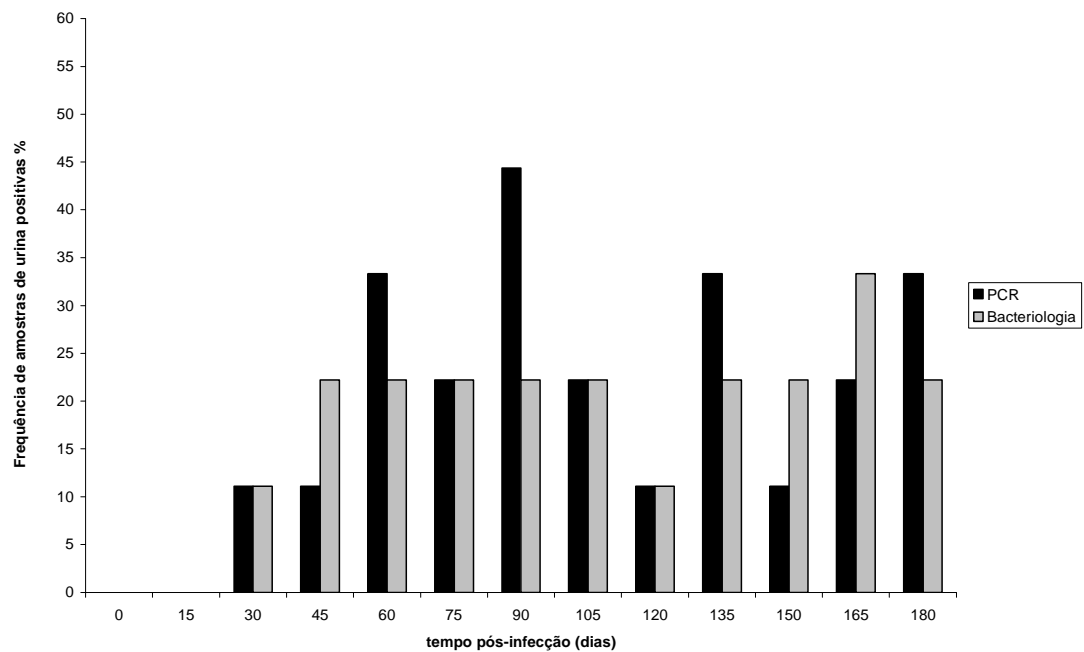


Figura 6. Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de urina ao longo de 180 dias de infecção experimental.

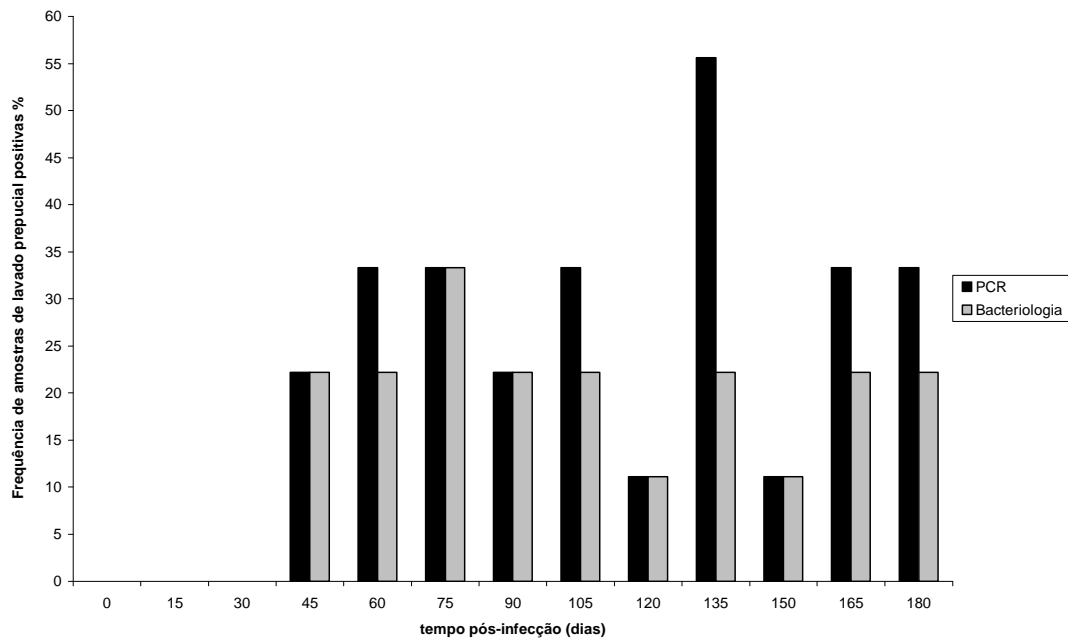


Figura 7. Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de lavado prepucial ao longo de 180 dias de infecção experimental.

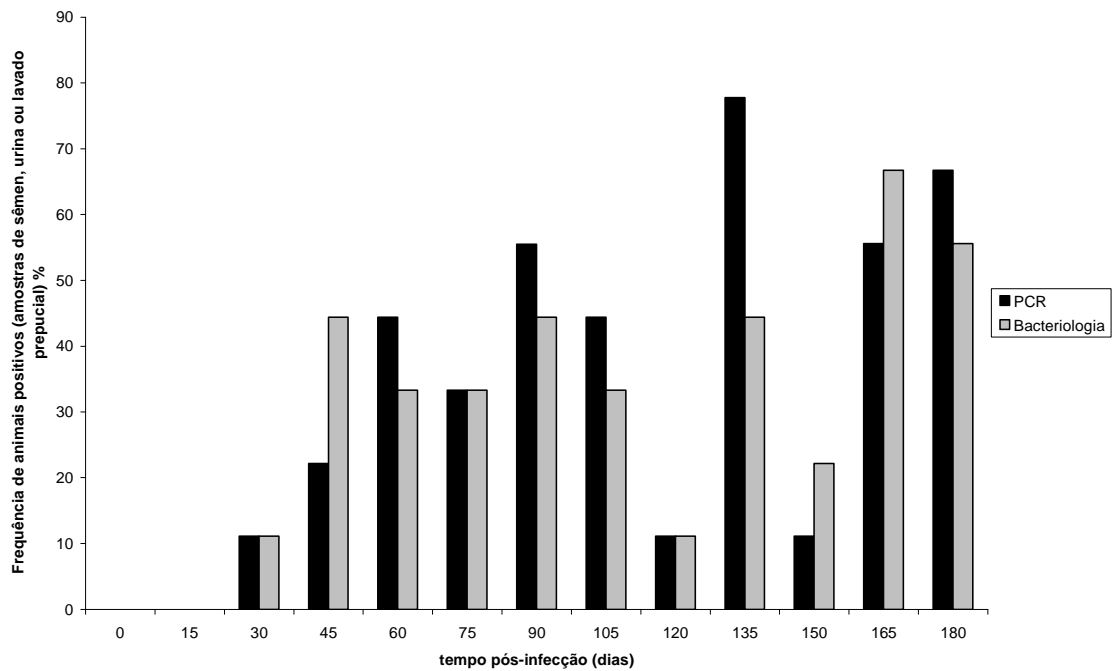


Figura 8. Frequência de animais positivos por PCR e bacteriologia para *Brucella ovis* em amostras de sêmen, urina ou lavado prepucial ao longo de 180 dias de infecção experimental.

A técnica de PCR foi capaz de identificar a excreção de *B. ovis* em amostras de sêmen, urina e lavado prepucial de 77,8% (7/9) dos animais experimentalmente infectados em algum ponto ao longo de 180 dias. Já o isolamento bacteriano detectou 55,6% (5/9), 77,8% (7/9) e 55,6% (5/9) de animais excretadores de *B. ovis* em amostras de sêmen, urina e lavado prepucial respectivamente ao longo do período experimental. Portanto os resultados obtidos demonstram que a detecção de *B. ovis* em amostras biológicas individuais de animais experimentalmente infectados pelas técnicas de PCR e bacteriologia foi semelhante ao longo da infecção (Figuras, 5, 6, 7 e 8). A técnica de PCR utilizada foi capaz de detectar 17,9; 19,7 e 22,2% de amostras positivas de sêmen, urina e lavado prepucial, respectivamente (Tabela 4). Já o isolamento

bacteriano foi capaz de detectar 16,2; 18,8 e 16,2% de amostras positivas para os mesmos fluidos corporais. Considerando-se todas as amostras, a PCR foi capaz de detectar 19,9% de amostras positivas, enquanto 17,1% das amostras foram positivas por isolamento. Não havendo diferença estatística significativa entre as duas técnicas ($P>0,05$). Adicionalmente, não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) na detecção de *B. ovis* por PCR ou bacteriologia entre os diferentes fluidos corporais avaliados. Não há estudos para detecção deste agente em lavado prepucial. Porém, como se trata de estudo experimental, em que a via de inoculação foi intraprepucial, o real valor deste tipo de amostra para o diagnóstico da brucelose ovina ainda precisa ser mais bem estudado, particularmente em casos de infecção natural.

Tabela 4. Frequência de amostras positivas para *Brucella ovis* em carneiros experimentalmente infectados, após 180 dias de inoculação.

Amostra	PCR	Bacteriologia
Sêmen	17,9 (21/117)	16,2 (19/117)
Urina	19,7 (23/117)	18,8 (22/117)
Lavado Prepucial	22,2 (26/117)	16,2 (19/117)
Órgãos	28,6 (54/189)	20,1 (38/189)
Total	23,0 (124/540)	18,1 (98/540)

Quarenta amostras de sêmen ovino liofilizado foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) – Bariloche, Argentina. Todas estas amostras eram provenientes de carneiros com resultados sorológicos variáveis pelo teste de ELISA (realizado segundo Nielsen et al., 2007) e oriundos de rebanhos naturalmente infectados por *B. ovis* (Anexo A4). Destas, 80% (32/40) eram provenientes de carneiros com sorologia positiva para *B. ovis*. Somente 23 dos quarenta animais possuíam diagnóstico baseado em isolamento bacteriano. Considerando-se os animais com diagnóstico sorológico, a PCR foi capaz de detectar a presença de *B. ovis* em 70% (28/40) das amostras.

Considerando-se as amostras com diagnóstico baseado também em isolamento bacteriano, a PCR foi capaz de detectar o DNA de *B. ovis* em 69,6% (16/23) das amostras, enquanto somente 47,8% (11/23) das amostras foram positivas por bacteriologia. Porém, não houve diferença estatística significativa entre os testes ($P>0,05$). Os resultados apresentados mais uma vez corroboram com o fato de que nem todos os animais sorologicamente positivos para *B. ovis* eliminam a bactéria no sêmen (Webb et al., 1980; Burgess, 1982; Worthington et al., 1984). Entretanto, em amostras de campo, o método de PCR utilizado foi capaz de detectar um número de animais positivos estatisticamente

semelhante ao número de animais positivos por sorologia e por isolamento bacteriano. Portanto, a técnica de PCR mostrou-se eficiente em detectar o agente em amostras provenientes de animais naturalmente infectados.

Não houve amplificação específica por PCR de DNA de *B. ovis* ou isolamento do agente em nenhuma das 32 amostras de sêmen, 31 amostras de urina e 32 amostras de lavado prepucial provenientes dos animais utilizados como controle negativo. Tal fato demonstra uma vez mais a alta especificidade do método de PCR utilizado no presente trabalho.

Considerando-se que todos os animais expostos ao desafio tornaram-se infectados, uma vez que todos apresentaram resultados positivos na prova de IDGA em algum ponto durante a infecção, a técnica de PCR apresentou sensibilidade de 19,4%, 21,3%, 24,1% e 20,4% para amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e a soma de todas as amostras, respectivamente. Neste caso, a técnica de isolamento apresentou sensibilidade de 17,6%, 20,3%, 17,6% e 17,6% para amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e a soma de todas as amostras respectivamente. Os valores de sensibilidade das técnicas utilizando este tipo de cálculo podem estar consideravelmente subestimados. Fatores que contribuiriam para tal fato seriam a eliminação intermitente do agente, a descrição da ocorrência de eliminação de *B. ovis* nos fluidos corporais somente após 45 dias de infecção e o fato de que alguns animais sorologicamente positivos nunca excretam *B. ovis* (Burguess, 1982; Blasco, 1990). Além disso, no presente experimento, após aproximadamente 3 meses de infecção, somente por volta de 60% dos animais (figura 4) apresentaram sorologia positiva para *B. ovis*, e portanto, poderiam ter debelado a infecção, cessando a eliminação do agente, como descrito por diversos autores (Biberstein, et al. 1964; Webb et al.,

1980; Burguess, 1982). A especificidade da técnica de PCR foi 100% utilizando este cálculo. Ainda assim, resultados aqui apresentados são semelhantes àqueles descritos por Nozaki (2008), que verificou sensibilidade de 21,6% e 12,7% para PCR de amostras de sêmen e urina, respectivamente. Porém, Manterola et al. (2003) descrevem uma sensibilidade maior da técnica de PCR, chegando a 51,9% para amostras de sêmen provenientes de animais experimentalmente infectados.

Uma segunda alternativa seria calcular a sensibilidade da técnica de PCR utilizando o isolamento bacteriano como “padrão-ouro”. Neste caso, a sensibilidade da PCR seria de 89,5%, 82%, 100% e 90,3% para amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e a soma de todas as amostras, respectivamente. Porém, como a técnica de PCR foi capaz de detectar um número maior de amostras positivas quando comparado à bacteriologia (Tabela 4), como descrito por outros autores (Fekete et al, 1990; Nozaki, 2008), a especificidade do teste foi prejudicada por esta forma de cálculo. A técnica de PCR não mais apresentou especificidade de 100% e sim 97,8%, 98,8%, 92,1% e 96,2% para amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e a soma de todas as amostras, respectivamente. Ainda assim, os resultados de sensibilidade e especificidade obtidos são semelhantes àqueles obtidos utilizando-se o isolamento bacteriano como diagnóstico. O valores de sensibilidade do método de PCR utilizado no presente estudo foram superiores àqueles encontrados por Manterola e colaboradores (2003), em cujo trabalho descreve valor de 84,6% para sensibilidade do método de PCR empregado quando comparado à amostras sabidamente positivas para *B. ovis* em isolamento bacteriano.

A concordância entre os métodos diagnósticos de PCR e isolamento bacteriano está detalhada nas Tabelas 5 e 6. O percentual de concordância entre testes

para as diferentes amostras biológicas provenientes de infecção experimental e natural testadas foi superior a 90% para intervalo de confiança de 95%, com valores de estatística kappa acima de 0,79. O valor de concordância obtido é inferior ao descrito por Manterola et al. (2003), que encontraram valor de kappa de 0,91. Porém, ambos os valores de kappa são considerados amplamente satisfatórios e indicam alta concordância entre os testes diagnósticos (Smith, 1994). Já Nozaki (2008) encontrou porcentagem de concordância entre bacteriologia e PCR inferiores àqueles descritos no presente trabalho. O percentual de concordância próximo à 75% associado à uma maior sensibilidade da técnica de PCR foram atribuídos, por outros autores, à falhas no meio seletivo Thayer-Martin modificado (Brown et al., 1971), como inibição de crescimento de algumas cepas de *B. ovis* e crescimento de grande número de contaminantes (Manterola et al., 2003). Estas possíveis falhas não foram observadas no presente estudo nas amostras experimentais. Porém, a concordância entre os testes diagnósticos foi inferior, com valores de 78,26% e kappa de 0,55, quando amostras de sêmen provenientes de animais naturalmente infectados foram avaliadas. Neste caso também houve uma maior sensibilidade da técnica de PCR quando comparada ao isolamento bacteriano e, portanto, falhas relacionadas ao meio de cultivo ou à viabilidade do microorganismo para realização do isolamento poderiam justificar os valores de concordância mais baixos.

Quando a técnica de PCR foi comparada ao diagnóstico sorológico, tanto para amostras provenientes de infecção experimental ou natural, os valores de concordância foram

baixos. O valor de kappa para as amostras experimentais foi de 0,13 e 61,52% de concordância e, para amostras de infecção natural, o valor de kappa foi de 0,33 e 75% de concordância entre testes. Enquanto a técnica de PCR pesquisa diretamente o agente (ou seu DNA genômico) em uma amostra, a técnica sorológica pesquisa a resposta imune do indivíduo à infecção. Diferenças já descritas relacionadas ao perfil intermitente de eliminação da *B. ovis* e flutuação de títulos de anticorpos em animais infectados justificam os valores encontrados (Biberstein, et al. 1964; Webb et al., 1980; Burgess, 1982; Blasco, 1990). Portanto, um valor de concordância baixo entre estes testes é esperado, uma vez que as duas técnicas utilizam maneiras distintas de identificar a infecção por *B. ovis* e devem ser utilizadas em conjunto para aumentar a eficiência de diagnóstico desta enfermidade.

A importância da eliminação da *B. ovis* pelo sêmen de animais infectados é amplamente conhecida (Burgess, 1982). Portanto, amostras de sêmen são aquelas de escolha para o diagnóstico definitivo da bactéria através do isolamento e, conseqüentemente, para realização de PCR. Entretanto, há descrições prévias de eliminação de *B. ovis* pela urina (Burgess, 1982; Cerri et al., 2002) em animais infectados. Este fato, somado à descrição no presente trabalho de sensibilidade e concordância de detecção do agente por PCR e isolamento em amostras de urina semelhantes àquelas encontradas para amostras de sêmen, fazem com que amostras de urina sejam também consideradas como amostras biológicas de escolha para diagnóstico da brucelose ovina.

Tabela 5. Frequência de concordância e valores de kappa para PCR e bacteriologia de amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e órgãos de carneiros experimentalmente infectados por *Brucella ovis*.

Amostra	N amostral	N concordância	Concordância (%)	Kappa
Sêmen*	172	161	93,60 (88,85-96,76)	0,796
Urina **	148	140	94,59 (89,63-97,64)	0,786
Lavado **	149	142	95,30 (90,56-98,09)	0,817
Órgãos	189	171	90,48 (85,37-94,26)	0,741
Total	658	614	93,31 (91,13-95,10)	0,781

Valores entre parênteses indicam variação do valor de concordância considerando-se intervalo de confiança de 95%.

* Soma das amostras de sêmen provenientes de infecção experimental (n=117), infecção natural (n=23) e controle negativo (n=32)

** Soma das amostras de urina ou lavado prepucial provenientes de infecção experimental (n=117), e controle negativo (n=32)

Tabela 6. Frequência de concordância e valores de kappa para PCR, bacteriologia e teste sorológico (ELISA) de amostras de sêmen e soro de carneiros naturalmente infectados por *Brucella ovis*.

Métodos	N amostral	N concordância	Concordância (%)	Kappa
PCR e sorologia	40	30	75,00 (58,80 - 87,31)	0,333
PCR e bacteriologia	23	18	78,26 (56,30 - 92,54)	0,552

Valores entre parênteses indicam variação do valor de concordância considerando-se intervalo de confiança de 95%.

A avaliação dos órgãos dos animais experimentalmente infectados demonstrou que 77,8% (7/9) dos carneiros apresentaram evidência bacteriológica de infecção por *B. ovis* em pelo menos um órgão examinado (Anexo A5). Considerando-se tanto os resultados de PCR e de isolamento, a *B. ovis* foi principalmente identificada em órgãos sexuais, principalmente na vesícula seminal e na cauda do epidídimo, além do linfonodo ilíaco interno e bexiga (Figura 9). A predileção deste agente pelo trato genital masculino já foi previamente descrita (Biberstein et al., 1964; Burgess, 1982; Worthington et al., 1984; Plant et al., 1986) e tal fato é justificado no presente trabalho pelo maior índice de isolamento do agente em vesícula seminal e epidídimos e linfonodos regionais, associado à baixa identificação do agente em sítios sistêmicos de infecção como o baço e o fígado. A baixa frequência de identificação de *B. ovis* em sítios sistêmicos pode estar relacionada ao período pós-inoculação em que os animais

foram eutanasiados, uma vez que a fase bacterêmica de disseminação sistêmica aparentemente ocorre por volta de 60 dias pós-infecção (Biberstein et al., 1964).

Houve identificação do agente em 33,3% (3/9) de amostras de glândula e prepúcio por isolamento bacteriano e em 44,4% (4/9) das mesmas amostras quando o método de PCR foi utilizado. Não há relatos na literatura de isolamento de *B. ovis* da genitália externa de carneiros. Apesar da via intraprepucial ter sido utilizada no presente trabalho, justificando um maior isolamento da bactéria da genitália externa, estes órgãos devem ser cuidadosamente examinados, podendo ser úteis no auxílio ao diagnóstico da infecção. Interessantemente, em 22,2% (2/9) e 44,4% (4/9) dos animais, houve identificação de *B. ovis* em amostras de bexiga por isolamento bacteriano e PCR, respectivamente. Embora diversos autores tenham relatado isolamento positivo de *B. ovis* no trato urinário de carneiros

infectados, principalmente nos rins (Biberstein et al., 1964; Burguess, 1982; Plant et al., 1986), somente Nozaki (2008) descreve o isolamento do agente na bexiga. A colonização do trato urinário de carneiros infectados somada à via única de passagem

de urina e secreções espermáticas através da uretra, justificaria o isolamento do agente em amostras de urina de animais positivos para *B. ovis*.

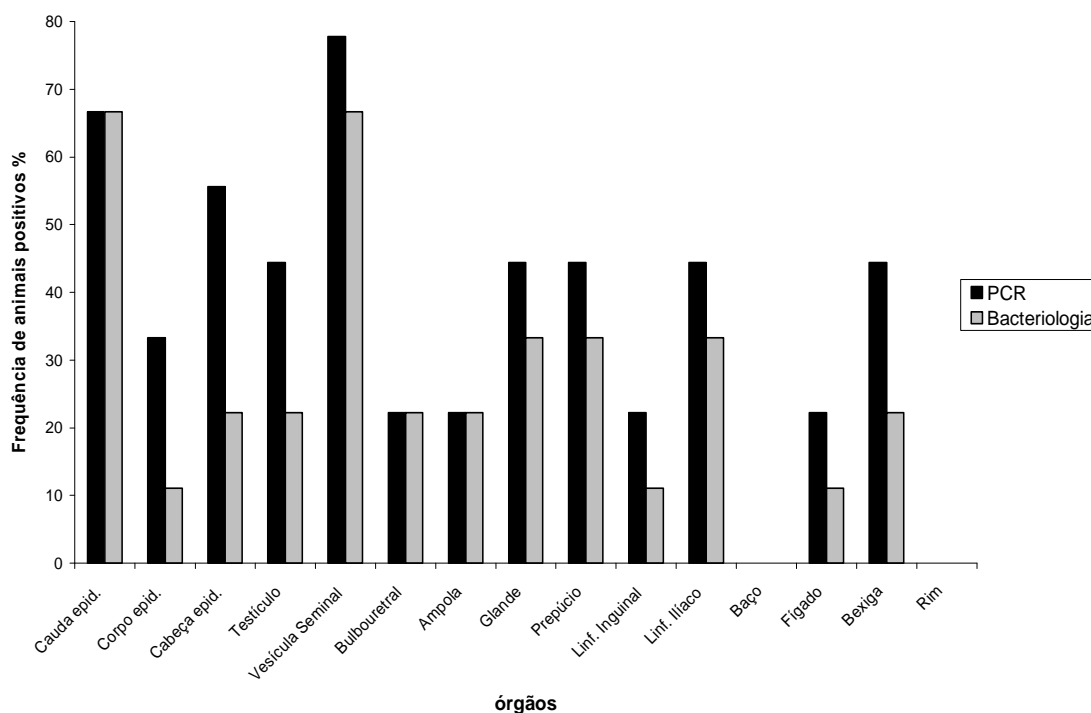


Figura 9. Frequência de amostras de órgãos positivas por PCR e bacteriologia em carneiros experimentalmente infectados por *Brucella ovis*, eutanasiados aos 192 dias pós-infecção.

Assim como descrito para as outras amostras biológicas, em amostras de tecidos, o método de PCR empregado foi capaz de detectar maior número absoluto de amostras positivas para *B. ovis* quando comparado com o isolamento bacteriano (Tabela 4). Enquanto 20,1% (38/189) de amostras de órgãos foram positivas por isolamento bacteriano, 28,6% (54/189) foram positivas por PCR. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os testes ($P > 0,05$). Ao contrário do observado no presente estudo, Nozaki (2008) verificou um baixo percentual de amostras de órgãos positivas por cultivo bacteriano quando comparado ao método de PCR utilizado. A

concordância entre PCR e isolamento bacteriano determinada para diagnóstico da infecção em órgãos de animais infectados foi de 90,48%, com estatística kappa apresentando valor de 0,741 (Tabela 5). A discreta queda observada nos valores de concordância para amostras de órgãos quando comparada às outras amostras testadas pode estar relacionada à maior sensibilidade do método de PCR para amostras de órgãos em relação ao isolamento. Ainda assim, a concordância entre os dois testes diagnósticos continua a ser considerada satisfatória (Smith, 1994), demonstrando o valor da técnica de PCR

para diagnóstico da brucelose ovina também em tecidos de animais infectados.

CONCLUSÃO

O método de diagnóstico desenvolvido pode ser considerado o primeiro método de PCR espécie-específico direto para o diagnóstico da brucelose ovina. Esta técnica de PCR mostrou-se igualmente específica e sensível quando comparada ao método convencional (isolamento bacteriano) e eficiente para o

diagnóstico da infecção por *B. ovis* em amostras de sêmen, urina, lavado prepucial e tecidos de carneiros infectados. Portanto, os dados apresentados demonstram que o método de PCR espécie-específico para *B. ovis* pode ser empregado no diagnóstico de rotina desta enfermidade, inclusive em amostras de urina, em associação com provas sorológicas, como uma alternativa mais rápida e prática ao isolamento bacteriano

CAPITULO III

Comparação entre dois métodos de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e um método de Fixação de Complemento (FC) para o diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella ovis* em carneiros

INTRODUÇÃO

O diagnóstico sorológico da brucelose ovina por *B. ovis* pode ser realizado através de diferentes testes já desenvolvidos (Santos et al., 2005). Entre os métodos sorológicos disponíveis, a fixação de complemento (FC), a imunodifusão em gel de agar (IDGA) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são comumente utilizados (Burguess, 1982; Blasco, 1990). A técnica de FC vem sendo empregada em programas de erradicação da doença, por ser considerada um método altamente específico (Burguess, 1982; Plant et al., 1986; West e Bruce, 1991). Porém, a FC é também considerada uma técnica trabalhosa e de difícil execução. Portanto, a técnica de IDGA, considerada rápida e de baixo custo, vem sendo empregada em substituição à FC em alguns países, inclusive no Brasil, para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* (MANUAL..., 2008).

O crescimento dos rebanhos ovinos nacionais voltados para a produção de corte, somado às exigências do mercado externo para o controle sanitário animal, resultou em maior demanda de métodos de diagnósticos eficazes para as doenças infecto-contagiosas dos animais de produção, incluindo ovinos (Marques, 2006). Portanto, considerando a importância crescente da ovinocultura nacional e a necessidade de métodos sorológicos eficientes para o diagnóstico da infecção por *B. ovis*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar três testes sorológicos disponíveis no Brasil para o diagnóstico da brucelose ovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Para a realização do estudo, foram obtidas 181 amostras de soro ovino, procedentes do estudo realizado previamente (Capítulo II). Dentre as amostras, 117 eram provenientes de nove carneiros experimentalmente infectados com *B. ovis* em diferentes períodos pós-infecção. Para a infecção experimental, as coletas de soro foram realizadas em intervalos quinzenais durante 192 dias pós-inoculação, totalizando 13 coletas, como descrito no Capítulo II. As 64 amostras restantes foram procedentes dos carneiros utilizados para a infecção experimental no período pré-infecção (n=9) e de ovinos de todas as faixas etárias pertencentes a um rebanho da região metropolitana de Belo Horizonte livre de *B. ovis* e sem histórico de epididimite ou infertilidade (n=55).

O sangue de todos os animais foi coletado através de venopunção jugular com utilização de sistema de vácuo estéril, sem anticoagulante (Vacuttainer) em tubos de 10 mL. Após a coagulação das amostras de sangue e obtenção dos soros, estes foram alicotados em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C até o momento de realização dos testes.

Imunodifusão em gel de agar (IDGA)

Para a realização do método de IDGA, foram utilizados os dois antígenos disponíveis no mercado brasileiro, sendo (i) antígeno produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) (antígeno

de lipopolissacarídeos e proteínas de parede celular de *B. ovis*, amostra REO 198) e (ii) antígeno produzido pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (Extrato solúvel obtido a partir de cultivo fresco de *B. ovis*, amostra REO 198, inativada pelo calor, IPVDF®). A técnica empregada foi descrita previamente no Capítulo II, sendo realizada de acordo com as recomendações dos fabricantes dos antígenos.

Fixação de Complemento (FC)

Para o presente estudo, foi empregada a FC em microtécnica descrita por Alton e colaboradores (1988), executada em placas de poliestireno com fundo em "Ü". Utilizou-se o antígeno produzido pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em diluição de uso de 1:60. Inicialmente, os soros foram submetidos à diluição de 1:2 em tampão Trietanolam e, em seguida, deixados em banho-maria a 60°C durante 30 minutos, com o objetivo de inativar o complemento presente no soro, para que não houvesse interferência na reação. Então, os soros foram distribuídos em placas de poliestireno e submetidos a uma série de diluições geométricas de razão dois, obtendo-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, de modo que, ao final da diluição, houvesse 25µL de soro em cada poço. Logo após a diluição das amostras de soro, foram adicionados à cada poço, 25 µL de antígeno seguidos de 25 µL de sistema de complemento e realizada incubação em estufa a 37°C por 30 minutos. Após a primeira incubação, foi executada a adição de 25 µL de sistema hemolítico, seguida de uma segunda incubação em estufa a 37°C por 30 minutos. A leitura das placas foi feita após centrifugação destas em temperatura ambiente a 1.500xg por 20 minutos. Para cada placa, foram utilizados soros controles positivo e negativo, além de serem realizados os controles do soro, complemento, antígeno sem complemento e sistema hemolítico. Para a interpretação dos

resultados, foi considerada a formação ou não de um botão de hemácias no fundo dos poços (indicativo de preservação da integridade da hemácia) associada ao grau de hemólise apresentado (coloração avermelhada do sobrenadante). Portanto, os resultados foram visualmente lidos para cada diluição e valores foram atribuídos ao grau de hemólise observado, sendo 0 (ausência de hemólise), 1 (75% de hemólise), 2 (50% de hemólise), 3 (25 % de hemólise) e 4 (100% de hemólise). Os títulos dos soros foram determinados pela recíproca da maior diluição que apresentou 75% ou menos de hemólise. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título igual ou superior a 4 (quatro).

Análise estatística

A análise de frequência de amostras positivas nos diferentes testes sorológicos foi avaliada pelo teste exato de Fisher com auxílio do programa GraphPad InStat software versão 3.05 (GraphPad InsStat software, Inc. San Diego, CA, EUA), considerando diferenças significativas quando o $P < 0,05$. Sensibilidade e especificidade dos testes foram calculados segundo Henken et al. (1997) utilizando o programa GraphPad InStat software versão 3.05 (GraphPad InsStat software, Inc. San Diego, CA, EUA). A comparação entre os testes diagnósticos foi realizada pela estatística kappa (Smith, 1994), utilizando o programa Minitab 15 (Global Tech, Belo Horizonte, MG, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em animais experimentalmente infectados, todas as três técnicas utilizadas foram capazes de detectar anticorpos em 55,6%, 77,8% e 77,8% dos carneiros para os testes de IDGA TECPAR, IDGA Desidério Finamor (DF) e FC, respectivamente, já aos 15 dias pós-inoculação (Figura 10). O maior percentual de animais positivos foi observado entre 30 e 60 dias pós-infecção

para todos os testes, sendo que 100% dos animais foram positivos pela prova de FC aos 30 e 45 dias pós-infecção, enquanto os testes de IDGA foram capazes de detectar anticorpos em até 88,9% dos animais neste mesmo período. O valor médio máximo (obtido por média geométrica) dos títulos de anticorpo anti-*B. ovis*, obtido pela prova de FC, ocorreu aos 30 dias pós-infecção (título médio = 24), com manutenção de valores significativos até os 75 dias pós-infecção (Figura 11). Estes resultados assemelham-se àqueles descritos por outros autores (Laws et al., 1972; Webb et al., 1980; Burgess, 1982; Plant et al., 1986, Nozaki, 2008), que demonstraram títulos detectáveis em provas sorológicas a partir de 2 semanas pós-infecção em animais experimentalmente infectados, com títulos máximos ocorrendo entre 49 e 77 dias pós-infecção.

A partir dos 60 dias pós-infecção, a frequência de animais positivos em ambas as provas de IDGA passou a oscilar até o final do estudo, com tendência a queda. Já a frequência de detecção de anticorpos anti-*B. ovis* pela prova de FC apresentou queda constante ao longo da infecção (Figura 10). Os títulos médios de anticorpos anti-*B. ovis* dos carneiros, obtidos pela prova de FC também seguiu este mesmo padrão (Figura 11). A partir dos 75 dias pós-infecção, houve queda significativa destes títulos, atingindo titulação média inferior 4, valor mínimo para

um animal ser considerado positivo na prova de FC. Este fato demonstra que, após os 75 dias de infecção, a maior parte dos animais passou a apresentar títulos baixos ou indetectáveis na prova de FC. A oscilação de resultados em provas sorológicas após 60 dias de infecção experimental já foi descrita por outros autores (Webb et al., 1980; Burgess, 1982; Plant et al., 1986, Nozaki, 2008). Esta oscilação, somada aos baixos títulos de FC encontrados provavelmente estão relacionados à diminuição de estímulo à produção de anticorpos, uma vez que, após os 60 dias de infecção, não há mais fase bacterêmica evidente e a infecção por *B. ovis* passa a estar restrita ao trato genital do animal (Biberstein et al., 1964). Muitas vezes, o agente encontra-se no órgão do animal sem causar um insulto evidente ao tecido capaz de justificar um estímulo inflamatório e antigênico constante. Além disso, há relatos na literatura que demonstram a falha de métodos sorológicos, notoriamente a FC, em detectar animais sabidamente positivos para *B. ovis*, principalmente em casos de carneiros cronicamente infectados (Hicks, et al. 1978; Hughes, 1982; West e Bruce, 1991). Alguns carneiros experimentalmente infectados ainda podem debelar a infecção e passar a não apresentar títulos sorológicos após a fase aguda de infecção (Biberstein, et al. 1964; Webb et al., 1980; Burgess, 1982).

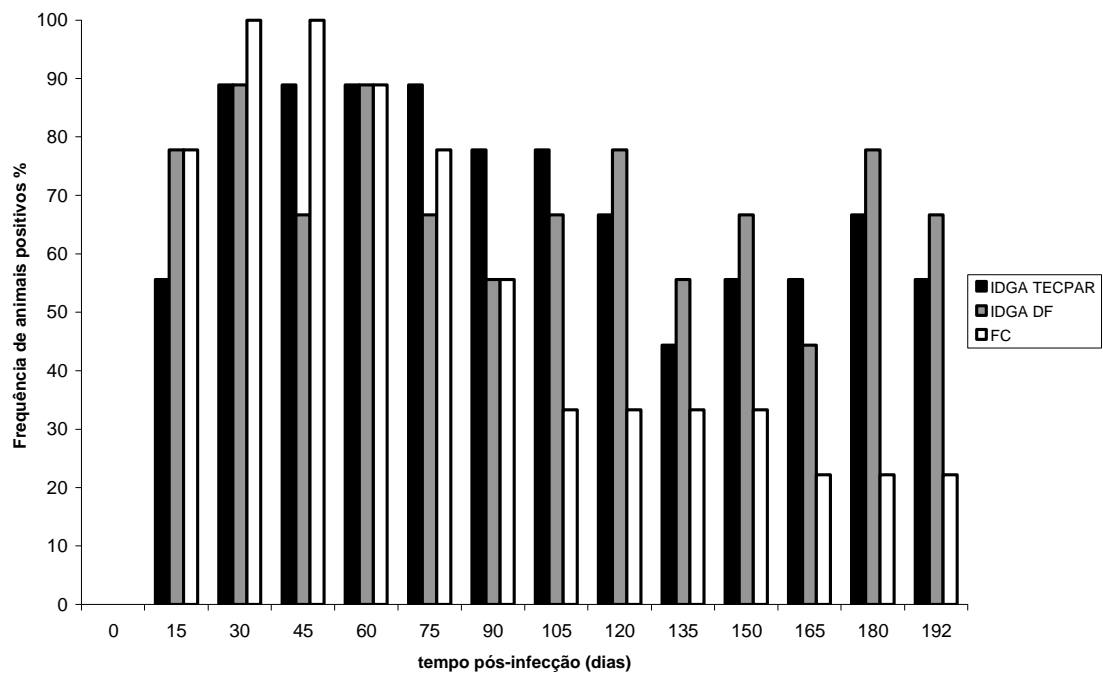


Figura 10. Frequência de carneiros soropositivos para os testes de IDGA antígeno TECPAR (IDGA TECPAR), IDGA antígeno Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e fixação de complemento (FC) para *Brucella ovis* ao longo de 192 dias de infecção experimental.

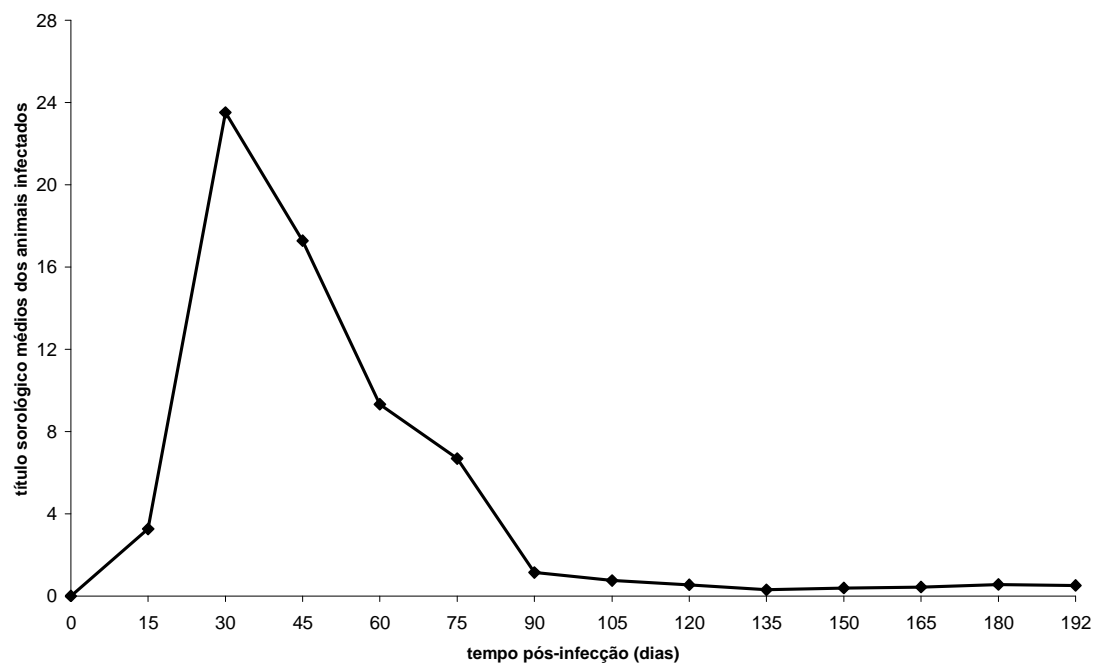


Figura 11. Títulos médios de anticorpos anti-*B. ovis* pela prova de fixação de complemento (FC) em soro de carneiros ao longo de 192 dias de infecção experimental.

Todas as 117 amostras provenientes de carneiros experimentalmente inoculados, obtidas ao longo de 192 dias pós-infecção, foram consideradas como amostras sabidamente positivas, uma vez que todos os nove animais foram submetidos a um alto desafio, este representado pela inoculação de $3,6 \times 10^9$ UFC/ animal de *B. ovis*. Já as outras 64 amostras restantes foram consideradas como amostras sabidamente negativas, uma vez que foram obtidas dos carneiros de infecção experimental no período pré-infecção (n=9) e de ovinos provenientes de rebanho livre da doença (n=55). A porcentagem total de amostras positivas pelas duas provas de IDGA foi estatisticamente semelhante, com frequência de 45,3% (82/181) e 44,7% (81/181) pelos testes de IDGA TECPAR e IDGA DF, respectivamente. Contudo, para a prova de FC, a frequência de amostras positivas foi de 33,7% (61/181) estatisticamente inferior ($P < 0,05$) aos métodos de IDGA. Estes resultados demonstram uma aparente menor capacidade do teste de FC para detectar animais sorologicamente positivos para *B. ovis*, melhor determinada pelo do cálculo de sensibilidade dos testes diagnósticos avaliados.

Para determinação mais precisa da sensibilidade dos testes diagnósticos avaliados, as amostras foram divididas em períodos mensais pós-infecção, entre 1 e 6 meses, com n=18 para cada período, exceto para o sexto mês, em que o n=27. Como foram obtidos resultados negativos em todas as 64 amostras sabidamente negativas em todos os três métodos diagnósticos avaliados, esta divisão não se aplicou para o cálculo de especificidade. Portanto, as duas

provas de IDGA e a técnica de FC apresentaram especificidade de 100% no presente estudo.

Os resultados de sensibilidade estão na Tabela 7. O método de IDGA utilizando antígeno do laboratório TECPAR apresentou valor máximo de sensibilidade, 88,8%, aos dois meses pós-infecção, com valores de sensibilidade estatisticamente semelhantes até os quatro meses pós-infecção. Nos últimos dois meses, a sensibilidade deste método caiu significativamente ($P < 0,05$), atingindo valores de até 50%. Já o método de IDGA utilizando antígeno do Instituto de Pesquisas Desidério Finamor (DF), obteve valores de sensibilidade estatisticamente semelhantes ao longo de toda a infecção, apesar de uma tendência a maior sensibilidade nos dois primeiros meses pós-inoculação. A prova de FC apresentou valores altos de sensibilidade, 88,8% e 94,4% para o primeiro e segundo mês respectivamente, nos dois primeiros meses pós-infecção. Porém, a partir do mês quatro, os valores de sensibilidade do método foram significativamente inferiores ($P < 0,05$), atingindo até 22,2% no último mês de infecção. A menor capacidade dos testes diagnósticos, notoriamente a FC e o IDGA TECPAR, em detectar carneiros soropositivos para *B. ovis* a partir de três meses pós-infecção pode ser justificada pela restrição da infecção ao trato genital (Biberstein et al., 1964), falhas dos métodos diagnósticos (Hicks, et al. 1978; Hughes, 1982; West e Bruce, 1991) ou pela capacidade de alguns animais de debelar a infecção após a fase aguda desta (Webb et al., 1980, Burgess, 1982; Plant et al., 1986), como discutido anteriormente.

Tabela 7. Sensibilidade dos métodos de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) utilizando antígeno TECPAR (IDGA TECPAR) e antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e prova de fixação de complemento (FC) para *B. ovis* ao longo de 6 meses de infecção experimental.

Método	Tempo pós-infecção (meses)						Total
	1	2	3	4	5	6	
IDGA TECPAR	72,2 ^{Aab}	88,8 ^{Aa}	83,3 ^{Aab}	72,2 ^{Aab}	50,0 ^{Ab}	59,3 ^{Ab}	70,1 ^{Aab}
IDGA DF	83,3 ^{Aa}	77,7 ^{Aa}	61,1 ^{Aa}	72,2 ^{Aa}	61,1 ^{Aa}	62,9 ^{Aa}	69,2 ^{Aa}
FC	88,8 ^{Aa}	94,4 ^{Aa}	66,6 ^{Aa}	33,3 ^{Bbc}	33,3 ^{Abc}	22,2 ^{Bc}	53,8 ^{Bb}

Valores acompanhados de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05) pelo Teste Exato de Fisher.

Valores acompanhados de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05) pelo Teste Exato de Fisher.

Entre os testes diagnósticos, houve diferença estatisticamente significativa na detecção de anticorpos anti-*B. ovis* a partir do quarto mês pós-infecção. A partir deste período, o método de FC, apresentando sensibilidade entre 33,3% e 22,2 %, foi significativamente (P<0,05) menos capaz de detectar animais sorologicamente positivos para *B. ovis* quando comparado aos demais métodos. Em contrapartida, ambos os métodos de IDGA apresentaram resultados de sensibilidade estatisticamente semelhantes ao longo de toda a infecção. Este mesmo padrão foi observado para a sensibilidade total dos três métodos, com valores de 70,1%, 69,2% e 53,8% para as provas de IDGA TECPAR, IDGA DF e FC respectivamente, em que a FC apresentou sensibilidade estatisticamente inferior aos dois demais métodos. Os valores de sensibilidade total encontrados no presente estudo para os métodos sorológicos avaliados diferem daqueles encontrados por outros autores. Robles (1998) encontrou valores de sensibilidade para o método de IDGA de 97,1% e Marin e colaboradores (1989) encontraram valores de sensibilidade de 96,4% e 92,7% para as provas de IDGA e FC, respectivamente. Já Worthington e colaboradores (1984) demonstraram valores de sensibilidade de 91,7% e 96,3% para os métodos de IDGA e FC, respectivamente. Porém, em todos estes estudos prévios, as amostras de soro avaliadas eram obtidas de

carneiros naturalmente infectados por *B. ovis*, em que o período de infecção e o grau de desafio a que os animais foram submetidos eram desconhecidos. Outro aspecto importante que pode influenciar nos resultados obtidos é o antígeno utilizado. Koerich e Vaz (2003) relataram a ocorrência de alta variabilidade entre partidas para os antígenos produzidos no Brasil, o que afeta a sensibilidade dos métodos sorológicos e dificulta a padronização do diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis*.

A análise de concordância entre os métodos sorológicos avaliados está apresentada na Tabela 8. Os métodos de IDGA apresentaram 86,74% de concordância entre si, com valor de kappa de 0,734, considerado satisfatório. Este resultado, somado aos valores de sensibilidade e valores preditivos semelhantes, demonstra que estes dois métodos podem ser igualmente empregados para o diagnóstico da infecção por *B. ovis*. Entretanto, a prova de FC apresentou concordância de resultados de 54,14% e 54,70% e valores de kappa de 0,201 e 0,215 para os métodos de IDGA TECPAR e IDGA DF, respectivamente. A baixa concordância com os outros métodos de IDGA, somada à menor sensibilidade e valor preditivo negativo, demonstra que o método de FC utilizado no presente estudo foi menos

eficiente no diagnóstico da infecção por *B. ovis*. A baixa eficiência do método de FC pode estar relacionada ao fato de que, na espécie ovina, a fixação do complemento é realizada somente pela classe IgG₁, enquanto todas as outras classes de IgG e possivelmente IgM participam do processo de aglutinação (Webb et al., 1980; Worthington et al., 1984). Além disso, não se sabe ao certo qual a classe de imunoglobulinas é predominante nos diferentes períodos de infecção por *B. ovis*. Fatores relacionados à técnica de FC

também poderiam contribuir para o resultado apresentado. O aquecimento do soro a 60°C por 30 minutos para inativação do complemento pré-existente resulta em uma possível perda de uma fração das imunoglobulinas presentes, que são termo-sensíveis (Webb et al., 1980). Esta perda pode ser determinante para o resultado do teste, principalmente na fase crônica da doença, em que o estímulo antígeno do agente já não é tão evidente, resultando em uma menor quantidade de imunoglobulinas no soro do animal afetado.

Tabela 8. Frequência de concordância e valores de kappa para os métodos sorológicos de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) utilizando antígeno TECPAR (IDGA TECPAR) e antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IDGA DF) e prova de fixação de complemento (FC) para *B. ovis* em amostras de soro ovino.

Métodos	N amostral	N concordância	Concordância (%)	Kappa
IDGA TECPAR e IDGA DF	181	157	86,74 (80,92 - 91,32)	0,734
IDGA TECPAR e FC	181	98	54,14 (46,59 - 61,56)	0,201
IDGA DF e FC	181	99	54,70 (47,14 - 62,09)	0,215

Valores entre parênteses indicam variação do valor de concordância considerando-se intervalo de confiança de 95%.

CONCLUSÃO

Os métodos de IDGA utilizando os antígenos produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor foram igualmente sensíveis e específicos para o diagnóstico sorológico da infecção por *B. ovis*. A utilização do método de IDGA deve ser preferida à utilização da técnica de FC para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* com os

antígenos testados, uma vez que a FC foi somente eficiente no diagnóstico da enfermidade até os 75 dias pós-infecção. Devido à ocorrência significativa de animais falso-negativos, representada pelo baixo valor preditivo negativo, o diagnóstico sorológico baseado na técnica de IDGA deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas disponíveis, como isolamento bacteriano e PCR, para que um diagnóstico eficiente da brucelose ovina por *B. ovis* seja alcançado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, HC; et al. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v.45, 1464-1470, 2007.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190p.
- AMIM, A.S.; HAMDY, ME; IBRAHIM, A.K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.*, v.83, p. 37-44, 2001.
- BARRON, S.J.; KOCAN, A.A.; MORTON, R.J.; et al. Susceptibility of male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Brucella ovis* infection. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.8, p. 1762-1764, 1985.
- BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 95, p. 271-275, 1992.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H.; et al. Epididymitis in ram: Studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, n.1, p.27-41, 1964.
- BLASCO, J.M.. *Brucella ovis*. In: Nielsen K; Duncan, JR. ed. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, CRC Press, p.351-378, 1990.
- BLASCO, J.M. La epididimitis contagiosa del morueco (infeccion por *Brucella ovis*) Revision bibliografica. *Comunicaciones I.N.I.A.*, n.5, 47 p., 1983.
- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, p. 435-446, 2002.
- BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1640-1642, 1994.
- BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet. Microbiol.*, v. 137, p. 156-164, 2009.
- BROWN, G.M.; PIETZ, D.E.; PRICE, D.A. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Vet.*, v.63, p. 29-40, 1973.
- 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.
- BUDDLE, M.B. Production of immunity against ovine brucellosis. *N Z Vet. J.*, v.2, p. 99-109, 1954.
- 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.
- BUDDLE, M.B. Vaccination in control of *Brucella ovis* infection in sheep. *N Z Vet. J.*, v.6, p. 41-46, 1958.
- BUDDLE, M.B; BOYES, B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust. Vet. J.I.*, v.29, p. 145-153, 1953.
- BULGIN, M.S. *Brucella ovis* epizootic in virgin ram lambs. *J. Am. Vet. Med.l Assoc.*, v.196, n.7, p. 1120-1122, 1990.
- BURGUESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p. 551-575, 1982.

- BURGUESS, 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.
- CAMERON, R.D.A; LAUERMAN JR., L.H. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Rec.*, v.99, p. 231-233, 1976.
- CARDOSO, M.R. I; COSTA, M.; BORTOLOZZO, F.P; et al. Alterações da morfologia espermática em carneiros naturalmente infectados pela *Brucella ovis*. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.17, p.39-48, 1989.
- CARVALHO-NETA, A.V.; MOL. J.P.S.; XAVIER, M.N.; et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, 2009, no prelo.
- CERRI, D.; AMBROGI, C.; EBANI, V.V.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in mouflon (*Ovis musimon*). *J. of Wildl. Dis.*, v.38, n.2, p.287-290, 2002.
- 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.
- 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.
- CLAPP, K.H; KEOGH, J.; RICHARDS, M.H. Epidemiology of ovine brucellosis in South Australia. *Aust. Vet. J.*, v.38, p. 482-486, 1962.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, v.54, p. 262-263, 1978.
- 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 do semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.4, p.137-143, 2007.
- CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; et al. Polymorphism at the *dnaK* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J. Med. Microbiol.*, v.45, p. 200-205, 1996.
- CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M.; et al. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, v.79, p. 500-501, 2001.
- COSTA, M.; GUILLOU, J.P.; GARIN-BASTUJI, B.; et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.*, v.81, p. 267-275, 1996.
- CRASTA, O.R.; FOLKERTS, O.; FEI, Z.; et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *Plos One*, v.3, n.5, e2193, 2008.
- CUBA-CAPARAÓ, A.; MYERS, D.M. Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. *Am. J. Vet. Res.*, v.34, n.8, p.1007-1085, 1973.
- DEBEAUMONT, C.; FALCONNET, P.A.; MAURIN, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.24, p. 842-845, 2005.
- DELVECCHIO, V.G., KAPATRAL, V., REDKAR, R.J., et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.443-448, 2002.
- DIAZ, R.; JONES, L.M.; WILSON, J.B. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and

- Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.*, v.93, p.1262-1268, 1967.
- 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.
- FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; et al. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.*, v.69, p.216-217, 1990.
- FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D.; et al. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.8, p.248-250, 1987.
- GALL, D.; NIELSEN, K.; VIGLIOCCO, A.; et al. Evaluation of an indirect-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rum. Res.*, v.48, p.173-179, 2003.
- GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.*, v.144, p.555-558, 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, n.8, 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.
- HENKEN, A.M., GRAAT, E.A.M., CASAL, J. Measurement of disease frequency. In: NOORDHUIZEN, J.P.T.M., FRANKENA, K., HOOFD, C.M. van der, GRAAT, E.A.M. *Application of quantitative methods in Veterinary Epidemiology*. The Netherlands: Wageningen Pers, 1997. Cap. IV, p.63-98.
- HERNAN, L.; RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p. 2099-2101, 1992.
- HICKS, J.D.; BURR, G.R.; MARSHALL, D.R.; et al. CFT inaccurate for epididymitis. *N Z Vet. J.*, v.26, p.34, 1978.
- HOMES, A.C.; CASARO, A.P.; CAMPERO, C.M.; et al. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Rev. Med.Vet. (Buenos Aires)*, v.75, n.4, p.302-306, 1994.
- HUGHES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection. 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.*, v.44, p.41-47, 1968.
- HUGHES, P.L. Further practitioner comment on *Brucella ovis*. *N Z Vet. J.*, v. 30, p. 201-203, 1982.
- KIM, S.; LEE, D.S.; SUZUKI, H. et al. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p. 615-618, 2006.
- KIMBERLING C.V.; ARNOLD, K.S.; SCHWEITZER, D.J.; et al. Correlation of the presence of seminal white blood cells and prevalence of separated spermatozoal heads with subclinical *Brucella ovis* infection in rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.189, n.1, p. 73-76, 1986.
- KOERICH, P.K.V.; VAZ, A.K. Comparação de antígenos utilizados no diagnóstico de *Brucella ovis*. *Rev. Ciên. Agrovet.*, v.1, n.2, p.52-54, 2003.
- LAWRENCE, W.E. Ovine brucellosis: A review of the disease in sheep manifested by

- epididymitis and abortion. *Br. Vet. J.*, v.117, p.435-446, 1961.
- LAWS, L.; SIMMONS, G.C.; LUDFORD, C.G. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.313-317, 1972.
- LIBAL, M.C.; KIRKBRIDE, C.A. *Brucella ovis*-induced abortion in ewes. *J. Am. Vet. Méd. Assoc.*, v.183, n.5, p.553-554, 1983.
- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.75-79, 1996.
- MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.65-72, 2003.
- MANUAL of standarts for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, cap. 2.7.9. 2008. Disponível: < <http://www.oie.int> >. Acesso em 13/09/2008.
- MARÍN, C.M.; BARBERAN, M.; JIMENES DE BAGUES, M.P.; et al. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, v.48, n.2, p.209-215, 1990.
- MARÍN, C.M.; JIMENES DE BAGUES, M.P.; BLASCO, J.M.; et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.*, v.125, n.20, p. 504-508, 1989.
- MARINHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.45-48, 1996.
- MARQUES, A.P.R. *Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e Brucella ovis em ovinos no estado de Minas Gerais*. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MATRONE M; KEID, L.B.; ROCHA, V.C.M.; et al. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* pcr detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, p. 480-489, 2009
- MCFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G.; et al. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust. Vet. J.*, v.28, p. 221-226, 1952a.
- MCFARLANE, D.; JEBSON, J.L.; HARTLEY, W.J.; et al. Ram epididymitis ewe abortion and lamb neonatal mortality. *Aust. Vet. J.*, v.28, p.226, 1972b.
- MCGOWAN, B.; BIBERSTEIN, E.L.; HARROLD B.S.; et al. Epididymitis in rams: the effect of the ram epididymitis organism (REO) on the pregnant ewe. *Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc.*, v.65, p. 291-296, 1961.
- MCGOWAN, B.; DEVINE, D.R. Epididymitis of rams: the effects of the naturally occurring disease upon fertility. *Cornell Vet.*, v.50, p. 103-106. 1960.
- MCGOWAN, B.; SCHULTZ, G. Epididymitis in rams. I. Clinical description and field aspects. *Cornell Vet.*, v.46, p.277-281, 1956.
- MEINERSHAGEN, W.A.; FRANK, F.W.; WALDHALM, D.G. *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, n.5, p.723-724, 1974.

- 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.
- MUHAMMED, S.I.; LAUERMAN, L.H.; MESFIN, G.M.; et al. Duration of *Brucella ovis* in ewes. *Cornell Vet.*, v.65, p.221-227, 1975.
- MYERS, D.M.; SINIUK, A. Preliminary report on the development of a diffusion-ingel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Appl. Microbiol.*, v.19, p.335-337, 1970.
- NAVARRO, E; SEGURA, J.C; CASTAÑO, M.J.; et al. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.42, p.1266-1273, 2006.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.L.; et al. Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by indirect enzyme immunoassay. *J. Immunoassay e Immunochem.*, v.28, n.3, p. 243-250, 2007.
- NOZAKI, C.N. *Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com Brucella ovis*. 2008. 102f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.*, v.81, p.170-276, 2006.
- OSBOURN, B.I.; KENNEDY, P.C. Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Vet. Pathol.*, v.3, p.110-136, 1966.
- PAOLICCHI, F.A.; CASARO, P.A.; GIMENO, E.J.; et al. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.36, p.7-15, 2000.
- PAOLICCHI, F.A. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermatocítica. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, v.82, n.2, p.86-88, 2001.
- PAULSEN, I., SESHADRI, R., NELSON, K., et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.13148-13153, 2002.
- PLANT, J.W.; EMAENS, 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.
- 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.
- RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD K.J.; et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *N Z Vet. J.*, v.48, p.57-59, 2000.
- RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD K.J.; et al. Effects of vaginal *Brucella ovis* infection of red deer hinds on reproductive performance, and venereal transmission to stags. *N Z Vet. J.*, v.50, p. 126-131, 2002.
- RIJPENS, N.P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; et al. Direct detection of *Brucella spp.* in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.33, p.1683-1688, 1996.

- ROBLES, C.A.; UZAL, F.A.; OLAECHEA, F.V.; et al. Epidemiological observations in a Corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Vet. Res. Commun.*, v.22, p.435-443, 1998.
- ROBLES, C. *Brucelosis em carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27 p.
- ROMERO C. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 615-617, 1995.
- ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.5, p. 3735-3737, 1999.
- SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.47, p.42-56, 2005.
- SAUNDERS, V.F.; REDDACLIFF, L.A.; BERG, T.; et al. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.*, v.85, n.1, p. 72-77, 2007.
- SEARSON, J.E. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.58, n.1, 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.
- SERGEANT, E.S.G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *N Z Vet. J.*, v.42, p. 97-100, 1994.
- SMITH, R.D. *Veterinary Clinical Epidemiology*, Boca Raton, USA, CRC Press, Boca Raton, 234p. 1994.
- 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. *Ciê. Anim.*, v.13, n.1, p. 51-54, 2003.
- SIMMONS, G.C.; HALL, W.T.K. Epididymitis in rams. *Aust. Vet. J.*, v. 29, p. 33-40, 1953.
- TORRES, E.D.N; APARICIO, E.D.; QUEZADA, F.V.; et al. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* em sementales ovinos jóvenes. *Vet. Mex.*, v.28, n.3, p.241-245, 1997.
- TSOLIS, R.M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *Plos one*, v.4, n.5, p. 1-9. 2009.
- VAN RENSBURG, S.W.J.; VAN HEEDEN, K.M.; LE ROUX, D.J.; et al. Infectious infertility in rams. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.*, v.29, p.223-233, 1958.
- VIGLIOCCO, A.M.; SILVA PAULO, P.S.; MESTRE, J.; et al. 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.
- XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P; et al. Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v.140, p.149-157, 2009a.
- XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; et al. The genus *Brucella* and clinical

manifestations of brucellosis. *Ciên. Rural*, v.39, p.2252-2260, 2009b.

WALKER, R.L.; LEAMASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N.; et al. 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.

WATT, D.A. Testicular abnormalities and spermatogenesis of the ovine and other species. *Vet. Bull.*, v.42, p.181-190, 1972.

WEBB, R.F.; QUINN, C.A.; COCKRAM, F.A.; et al. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.56, p.172-175, 1980.

WEST, D.M.; BRUCE, R.A. Observations on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. *N Z Vet. J.*, v.39, p.29-31, 1991.

WEST, D.M.; STAFFORD, M.R.; ALLEY, M.R.; et al. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. *N Z Vet. J.*, v.41, p.82-86, 1993.

WORTHINGTON, R.W.; WEDDEL, W.; PENROSE, M.E. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *N Z Vet. J.*, v.31, p.58-60, 1984.

WORTHINGTON, R.W.; STEVENSON, B.J.; DE LISLE, G.W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N Z Vet. J.*, v.33, p.84-86, 1985.

ANEXO A – Resultados de infecção experimental por tipo de amostra

Anexo A1. Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de sêmen de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção.

Animal	Tempo pós-infecção (dias)													
	0		15		30		45		60		75		90	
	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Animal	Tempo pós-infecção (dias)											
	105		120		135		150		165		180	
	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo

Anexo A2. Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de urina de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção.

Tempo pós-infecção (dias)														
	0		15		30		45		60		75		90	
Animal	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tempo pós-infecção (dias)													
	105		120		135		150		165		180		
Animal	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	
1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	

+: positivo; -: negativo

Anexo A3. Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de lavado prepucial de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* ao longo da infecção.

		Tempo pós-infecção (dias)													
		0		15		30		45		60		75		90	
Animal		PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC
1		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		Tempo pós-infecção (dias)											
		105		120		135		150		165		180	
Animal		PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC	PCR	BAC
1		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
4		-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
5		+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
6		+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
7		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo

Anexo A4. Resultados de sorologia (ELISA), bacteriologia e PCR de animais pertencentes a rebanhos naturalmente infectados por *Brucella ovis*.

Animal	Idade	Sorologia (ELISA)	Bacteriologia	PCR
FAZENDA 1				
36	> 4 anos	+	-	+
270	> 4 anos	+	-	-
437	> 4 anos	+	-	-
651	3 anos	+	-	+
FAZENDA 2				
56	> 4 anos	+	+	+
122	> 4 anos	+	+	+
146	> 4 anos	+	+	+
221	> 4 anos	+	+	+
301	> 4 anos	+	+	+
332	3 anos	+	+	+
335	2 anos	+	+	+
348	> 4 anos	+	+	+
597	4 anos	+	+	+
685	3 anos	+	+	+
793	2 anos	+	+	+
163	> 4 anos	-	-	-
196	> 4 anos	-	-	-
205-R	4 anos	-	-	-
301-AZ	3 anos	-	-	+
311	3 anos	-	-	-
339	> 4 anos	-	-	+
346	3 anos	-	-	-
629	3 anos	-	-	+
FAZENDAS 3 e 4				
57	NI	+	NR	+
58	NI	+	NR	+
51	NI	+	NR	-
46	NI	+	NR	+
70	NI	+	NR	+
68	NI	+	NR	+
2	2 anos	+	NR	+
5	2 anos	+	NR	-
8	2 anos	+	NR	+
9	2 anos	+	NR	-
11	2 anos	+	NR	-
12	2 anos	+	NR	+
13	2 anos	+	NR	-
14	2 anos	+	NR	+
15	2 anos	+	NR	+
18	2 anos	+	NR	+
20	2 anos	+	NR	+

+: positivo; -: negativo; NR: não realizado

Anexo A5. Resultados de PCR e bacteriologia (BAC) de amostras de órgãos de animais experimentalmente infectados com *Brucella ovis* eutanasiados aos 192 dias pós-infecção.

Órgão	Animal														
	1			2			3			4			5		
	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g
Cauda epid. D	+	+	3,6 x 10 ¹	-	-	-	+	+	4,8 x 10 ⁵	-	-	-	-	-	-
Cauda epid. E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	8,6 x 10 ¹	-	-	-
Corpo epid. D	-	-	-	-	-	-	+	+	2,9 x 10 ²	-	-	-	-	-	-
Corpo epid. E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cabeça epid. D	-	-	-	-	-	-	+	+	4,9 x 10 ²	+	-	-	-	-	-
Cabeça epid. E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testículo D	-	-	-	-	-	-	+	+	5,2 x 10 ¹	+	-	-	-	-	-
Testículo E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ves. Seminal D	+	+	7,8 x 10 ¹	-	-	-	+	+	6,5 x 10 ³	+	+	1,6 x 10 ²	-	-	-
Ves. Seminal E	+	+	8,1 x 10 ¹	-	-	-	-	+	6,4 x 10 ²	+	-	-	-	-	-
Bulbouretral D	-	-	-	-	-	-	+	+	2,4 x 10 ³	-	-	-	-	-	-
Bulbouretral E	-	-	-	-	-	-	+	+	8,5 x 10 ²	-	-	-	-	-	-
Ampola	-	-	-	-	-	-	+	+	1,7 x 10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Glande	-	-	-	-	-	-	+	+	8,8 x 10 ³	+	+	4,3 x 10 ²	-	-	-
Prepúcio	-	-	-	-	-	-	+	+	3,1 x 10 ²	+	-	-	-	-	-
Linf. Inguinal	+	+	2,2 x 10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. Ilíaco	+	+	1,6 x 10 ²	-	-	-	+	-	-	+	+	1,7 x 10 ²	-	-	-
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bexiga	+	-	-	-	-	-	+	+	9,3 x 10 ³	-	-	-	-	-	-
Rim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Órgão	Animal														
	6			7			8			9			Total %		
	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	UFC/g	PCR	BAC	
Cauda epid. D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1,4 x 10 ²	33,3 (3/9)	33,3 (3/9)	
Cauda epid. E	-	-	-	+	+	1,9 x 10 ²	+	+	3,8 x 10 ¹	+	-	-	44,4 (4/9)	33,3 (3,9)	
Corpo epid. D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1 (1/9)	11,1 (1/9)	
Corpo epid. E	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	22,2 (2/9)	0 (0/9)	
Cabeça epid. D	+	-	-	+	+	4,7 x 10 ¹	+	-	-	-	-	-	55,6 (5/9)	22,2 (2/9)	
Cabeça epid. E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0/9)	0 (0/9)	
Testículo D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3 (3/9)	11,1 (1/9)	
Testículo E	-	-	-	-	-	-	+	+	9,1 x 10 ¹	-	-	-	11,1 (1/9)	11,1 (1/9)	
Vesícula D	+	+	8,9 x 10 ¹	-	-	-	-	-	-	+	+	1,2 x 10 ²	55,6 (5/9)	55,6 (5/9)	
Vesícula E	+	+	5,2 x 10 ¹	+	-	-	+	+	1,3 x 10 ²	-	-	-	55,6 (5,9)	44,4 (4/9)	
Bulbouretral D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	9 x 10 ¹	22,2 (2/9)	22,2 (2/9)	
Bulbouretral E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1 (1/9)	11,1 (1/9)	
Ampola	-	-	-	-	-	-	+	+	3,2 x 10 ¹	-	-	-	22,2 (2/9)	22,2 (2/9)	
Glande	-	-	-	-	-	-	+	+	2,9 x 10 ²	+	-	-	44,4 (4/9)	33,3 (3/9)	
Prepúcio	-	-	-	-	-	-	+	+	2,5 x 10 ²	+	+	3,9 x 10 ²	44,4 (4/9)	33,3 (3/9)	
Linf. Inguinal	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	22,2 (2/9)	11,1 (1/9)	
Linf. Ilíaco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	8,8 x 10 ¹	44,4 (4/9)	33,3 (3/9)	
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0/9)	0 (0/9)	
Fígado	-	-	-	-	-	-	+	+	3,9 x 10 ¹	-	-	-	22,2 (2/9)	11,1 (1/9)	
Bexiga	-	-	-	+	+	6,5 x 10 ¹	+	-	-	-	-	-	44,4 (4/9)	22,2 (2/9)	
Rim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0/9)	0 (0/9)	

+: positivo; -: negativo

ANEXO B - Resultados de infecção experimental por animal

Anexo B1. Carneiro 1

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/32
45	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	2/8
60	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	2/8
75	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1/16
90	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2/8
105	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	1/16
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
135	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2/8
150	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
165	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
180	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B2. Carneiro 2

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/16
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4/16
45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2/8
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/4
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B3. Carneiro 3

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/8
30	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	1/32
45	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	4/64
60	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2/64
75	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1/64
90	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2/32
105	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1/32
120	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	3/16
135	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	4/16
150	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	4/8
165	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1/32
180	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	3/32
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	3/16

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B4. Carneiro 4

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1/4
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3/8
45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2/8
60	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	1/8
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3/8
90	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/4
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
135	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
165	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
180	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B5. Carneiro 5

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3/16
45	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	2/8
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/4
75	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	1/8
90	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
105	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
135	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
165	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
180	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B6. Carneiro 6

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/32
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/64
45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/32
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/16
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2/8
90	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	1/4
105	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
135	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
165	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
180	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B7. Carneiro 7

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	Sul	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/4
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/32
45	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	1/32
60	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	3/8
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/8
90	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
135	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
165	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
180	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B8. Carneiro 8

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/16
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/64
45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2/64
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3/32
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1/32
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/16
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/16
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4/16
135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/16
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/4
165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/8
180	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1/4
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+	1/4

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.

Anexo B9. Carneiro 9

Dias P.I.	Sêmen		Sangue		Urina		Lavado		Sorologia		
	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	PCR	BACT	TECPAR	DF	FC
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/8
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
135	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
150	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
165	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Necrópsia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	-

+: positivo; -: negativo; P.I.: pós-infecção; BACT: bacteriologia; TECPAR: IDGA com antígeno TECPAR; DF: IDGA com antígeno do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; FC: Fixação de complemento; NR: não realizado.