

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DOS
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS NAS FASES DE EVOLUÇÃO DA
BRUCELOSE EM OVINOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *BRUCELLA OVIS***

CRISTIANE NAKADA NOZAKI

Botucatu – SP
fevereiro/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DOS
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS NAS FASES DE EVOLUÇÃO DA
BRUCELOSE EM OVINOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *BRUCELLA OVIS***

CRISTIANE NAKADA NOZAKI

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Jane Megid

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Rosemeire Aparecida Vicente*

Nozaki, Cristiane Nakada.

Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*/ Cristiane Nakada Nozaki. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Jane Megid

Assunto CAPES: 50502018

1. Epidemiologia animal. 2. Brucelose. 3. Ovino.

CDD 636.089449

Palavras-chave: *Brucella ovis* REO 198; Brucelose ovina; Diagnósticos;
Inoculação experimental; PCR.

DEDICATÓRIA

Á minha filha, Letícia

Sei o quanto foi difícil passar por todas as situações enquanto estava no meu ventre, você foi forte e superou todos os obstáculos. Depois de chegar ao mundo teve que abrir mão de estar ao lado do pai todos os dias para que eu pudesse concluir este trabalho, fora as viagens demoradas todo final de semana que você agüentava para chegarmos em casa. Mesmo passando por tudo isso, todo dia abria os meus dias com seu sorriso, por isso eu tive forças para continuar.

Só posso te dizer agora que você é a razão da minha vida e graças ao seu amor eu tenho estímulos para continuar a lutar pelos meus objetivos.

À minha mãe, Àuria

Que abriu mão da sua vida e da sua casa para me acompanhar e cuidar da minha filha para que eu pudesse concluir este trabalho. Hoje eu sei que só uma mãe sacrificaria sua vida por um filho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **DEUS**, pela força e coragem nos momentos difíceis. Por sempre me guiar para que tomasse as melhores decisões em toda minha vida.

Ao **Meu pai Hiroyuki Nozaki**, meu herói por toda vida, sempre se esforçou para que a gente tivesse os melhores estudos. Se hoje eu cheguei até aqui, devo tudo a você.

À **Dra. Jane Megid**, que há oito anos abriu as portas de seu laboratório e se transformou além de uma orientadora em uma grande amiga. Obrigada por todos os ensinamentos.

Às minhas irmãs, **Gisele, Denise e Priscila**, que sempre estiveram ao meu lado e me proporcionam momentos alegres e carinhosos quando estamos juntas.

À minha **avó Ana**, que me ensinou a sempre ter força para lutar. A minha querida **tia Laura**, que em muito contribuiu para minha formação, principalmente com seus “cursos de férias”. Muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos **Hymerson e Leandro**, que arranjaram um tempo na sua pós-graduação para me ajudar durante toda a etapa preparatória para a realização das colheitas e se tornaram grandes amigos.

Ao funcionário **Jairo Zucari**, que me ajudou em várias colheitas e sempre teve paciência para me ajudar a organizar todos os materiais da pesquisa, realizando até coisas além da sua função.

À minha amiga **Nair Lira**, que me substituiu enquanto eu estava de licença e se tornou uma grande amiga durante nossas colheitas. Que ajudou a transformar nossas colheitas em momentos prazerosos. Sentiremos saudades de todos os momentos difíceis e engraçados que passamos juntas.

À minha grande amiga-irmã **Taís Fukuta**, não tenho palavras para dizer o quanto você foi importante na minha vida. Só posso dizer que nossa amizade será eterna.

À minha "dinda" **Carla Moraes**, obrigada pela grande amizade, confiança e todos os ensinamentos que me proporcionou. Em todos os momentos você sempre esteve e estará presente em minha vida.

À amiga **Vanessa Salgado** que me ajudou com as PCRs e se tornou minha grande amiga.

Aos meus grandes amigos **Cristina Brito** e **Leandro Moretti**, pelo carinho e amizade que perduram até hoje.

Ao meu colega **Otávio** pela ajuda nas colheitas, com o seu jeitinho “organizado e acelerado” permitiu que facilitássemos as colheitas.

Aos meus amigos **Bruno, Fernando e Paulo**, que foram contratados para nos ajudar nas colheitas e se tornaram grandes amigos. Vocês foram essenciais para que as colheitas se tornassem divertidas.

Ao Médico Veterinário **Maurício Dasso** do Centro de Pesquisa Veterinária “DESIDERIO FINAMOR” FEPAGRO - Eldorado do Sul / RS, que se tornou um grande amigo e sem me conhecer pessoalmente, cedeu todo antígeno utilizado na prova de imunodifusão do experimento e tirava todas minhas dúvidas através de emails. Obrigada pelo apoio.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia **Fernando José Paganini Listoni** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela paciência e por todo ensinamento transmitido no processo microbiológico, obrigada por todas as dicas transmitidas.

Aos meus amigos **Wellington Borges**, **Fábio Shimabukuro**, **Rodrigo Silva** e **André Menezes** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pelo carinho e por todos os momentos alegres em que passamos juntos.

Ao **Prof. Sony Dimas Bicudo**, pessoa extremamente atenciosa, que deixava seus afazeres de lado para tirar minhas dúvidas e cedeu seu laboratório para que eu pudesse aprender toda parte da análise espermática.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Paulo Domingues** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela amizade e ensinamentos.

Aos funcionários **Wanderley Furlin**, **Sérgio** secretários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, seu **Humberto** e **D. Rita** da limpeza, obrigada pela amizade, auxílio e paciência.

À bibliotecária **Meire** pela paciência na correção das referências bibliográficas.

Àos professores **Antônio Carlos Paes**, **Márcio Garcia Ribeiro** e **Luiz Carlos** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública por sempre me auxiliarem quando precisei.

A **CAPES** por ter concedido financiamento de bolsa, ao longo desses três anos.

A técnica de laboratório **Adriana Pavã** que sempre auxiliou na lavagem e esterilização dos materiais utilizados no experimento, meu muito obrigado.

"Todos tem um propósito de vida... um Dom singular ou um talento único para dar aos outros. E quando misturamos esse talento singular com benefícios aos outros, experimentamos o êxtase da exultação de nosso próprio espírito - entre todos, o supremo objetivo."

(Deepak Chopra / As Setes Leis Espirituais do Sucesso)

Nome do Autor: Cristiane Nakada Nozaki

Título: Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Jane Megid
Orientadora
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Luis Antônio Mathias
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
FCAV – UNESP - Jaboticabal

Carlos A. Robles
Membro
Departamento de Produção Animal
INTA – Bariloche – Argentina

Prof. Dr. Renato de Lima Santos
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Escola de Veterinária da UFMG – Belo Horizonte

Prof. Dr. Júlio César de Freitas
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2008.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultado do isolamento e PCR para *B. ovis* em carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, segundo o material clínico investigado. Pág. 43
Botucatu-SP, 2004-2007.
- Tabela 2 - Medidas descritivas da porcentagem de concordância entre os testes de PCR e cultivo bacteriano, segundo tipo de amostras. Pág. 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Number of positive animais associated to the number of animals with clinical signs in experimentally inoculated animais with *B. ovís* REO 198 Pág. 28
- Figura 2 - Freqüência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em amostras de sêmen de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovís* REO 198. Botucatu-SP. Pág. 43
- Figura 3 - Freqüência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em amostras de urina de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovís* REO 198. Botucatu-SP Pág. 44
- Figura 4 - Freqüência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em diferentes órgãos de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovís* REO 198, número de amostras totais. Botucatu-SP. Pág. 44
- Figura 5 - Número de animais positivos nos diferentes testes sorológicos de ovinos inoculados experimentalmente com *B. ovís* REO 198 em diferentes fases. Botucatu-SP, 2004-2007. Pág. 59
- Figura 6 - Percentual de animais positivos nos diferentes testes sorológicos correlacionados com o percentual de alterações clínicas de ovinos inoculados experimentalmente com *B.ovís* REO 198 em diferentes fases. Botucatu-SP, 2007. Pág. 60
- Figura 7 - Limites de concordância entre as provas sorológicas de SAR e IDGA nas diferentes semanas de soros de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovís* REO 198, 2004-2007. Pág. 60

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO 1	
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	6
CAPÍTULO 2 – Pathogenicity and infective potential of <i>Brucella ovis</i> REO 198 in rams inoculated experimentally	
	24
Abstract	24
	34
CAPÍTULO 3 - Adaptação e avaliação da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase frente ao cultivo microbiano em diferentes materiais de carneiros inoculados experimentalmente com <i>B. ovis</i>	
Resumo	34
Abstract	34
CAPÍTULO 4 – Perfil sorológico de carneiros inoculados experimentalmente com <i>Brucella ovis</i> em diferentes fases da doença: I– associação com sinais clínicos; II- avaliação do teste de imunodifusão em ágar gel e teste de soroaglutinação rápida	52
Resumo	52
Abstract	52
CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES GERAIS	68
BIBLIOGRAFIA	71
Anexo A	81
Anexo B	93

NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*. Botucatu, 2007. 102p.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade e o potencial infectante da *Brucella ovis* REO 198 em carneiros inoculados experimentalmente, estudar o perfil sorológico destes animais e associa-los aos sinais clínicos, analisando o teste de imunodifusão em ágar gel e soroaglutinação rápida. Adicionalmente, adaptar e avaliar uma técnica de PCR frente ao cultivo bacteriano em diferentes materiais. Foram utilizados 36 carneiros, sendo 31 submetidos à inoculação via conjuntival e via intraprepucial de uma solução contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis* REO 198, simultaneamente e cinco submetidos a inoculação, pelas mesmas vias, de solução fisiológica, mantidos como grupo controle. Todos os animais inoculados foram submetidos, semanalmente, à avaliação clínica, colheita de sangue para diagnóstico sorológico, sêmen e urina para cultivo e realização da PCR. Sorologia positiva foi observada nos animais, por ambas as provas, a partir da 2ª semana, observando-se flutuações de títulos. Alterações clínicas se iniciaram a partir da 5ª semana pós-inoculação estando associada à sorologia positiva na fase aguda da enfermidade. Eliminação de *B. ovis* pode ser observado por cultivo e PCR nas amostras de sêmen e urina de modo intermitente. Infecção natural foi observada em três animais não inoculados e contactantes eventuais do grupo inoculado experimentalmente. Destaca-se o caráter patogênico e infectante da *Brucella ovis* REO 198, a importância das excreções destes animais como vias de eliminação e a condição destes como potenciais fontes de infecção. A IDGA demonstrou ser a mais favorável no uso como diagnóstico de rotina, enquanto a SAR diagnosticou apenas animais na fase aguda da doença. A PCR de sêmen ou urina dos animais associada ao cultivo microbiológico demonstrou melhor sensibilidade de detecção, sugerindo a associação das técnicas para um diagnóstico eficiente.

Palavras-chave: *Brucella ovis* REO 198, brucelose ovina, epidemiologia, inoculação experimental, PCR.

NOZAKI, C.N. **Epidemiological and clinical aspects and evaluation of the methods of diagnosis in the phases of evolution of the brucellosis in rams**

experimentally inoculated with *Brucella ovis*. Botucatu, 2007. 102p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the pathogenicity and infective potential of *B. ovis* REO 198 and to determine the serological profile of rams experimentally inoculated using immunodiffusion in agar gel and rapid serum agglutination test associated with clinical signs, as well as to adapt and evaluate PCR compared with microbiological culture in the different samples. Thirty one rams, 1-2 years old, were submitted to conjunctival and intrapreputial simultaneous inoculation with a solution containing 2×10^9 CFU/mL *B. ovis* REO 198. The other five animals constituted the control group and were inoculated by the same routes with sterile saline solution. All animals inoculated were weekly submitted to clinical evaluation, as well as collection of blood for serological diagnosis, and collection of semen and urine for culture and PCR. Positive serology was observed beginning in the third week, and decreasing soon after the fifth week after inoculation. Both tests detected fluctuations in titers. Clinical alterations began in the 5th week after inoculation and were associated with positive serology in the acute phase of the disease. *B. ovis* was observed in semen and in urine culture in an intermittent manner. Natural infection was observed in three non-inoculated animals that occasionally contacted animals of the infected group. The pathogenic and infective characteristics of *B. ovis* REO 198 were highlighted, as well as the importance of animal excretion as routes of elimination, and the condition of the animals as potential sources of infection. IDGA showed variable sensitivity in the different periods, detecting positive animals in the chronic phase of the disease, and was the preferred method to be used in routine diagnosis, whereas SAR just diagnosed animals in the acute phase of the disease. The semen or urine PCR associated to microbiological culture is recommended for an efficient diagnosis.

Key Words: *Brucella ovis* REO 198, brucellosis, epidemiology, experimental inoculation, diagnosis.

1- INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa crônica comum a diversas espécies de animais. Apresenta importância considerável sob o ponto de vista econômico, com prejuízos para a produção de lã, carne e leite, conseqüente a diminuição da fertilidade dos carneiros, descarte e substituição dos reprodutores, diminuição da taxa de prenhez, diminuição da taxa de parição e aumento do número de repetições deaios (HOMSE, CASARO e CAMPERO, 1995, BAIGUN, CONIGLIARO e LUNA, 2000). O agente etiológico da brucelose ovina é *Brucella ovis*, espécie rugosa que é cultivada em ambiente de 10% de CO₂ para isolamento primário. A *B. ovis* causa doença genital manifestada por epididimite em carneiros e placentite nas ovelhas com conseqüente redução na fertilidade do rebanho (LÓPEZ et al., 2005).

A principal forma de transmissão é a via venérea durante a monta natural. Entre machos, a transmissão direta foi demonstrada ao saltarem uns sobre os outros (mucosa retal) ou indiretamente (mucosa nasal, palpebral e prepúcio), a partir de ejaculações (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986; BULGIN, 1990; HOMSE, CASARO e CAMPERO, 1995; GRILLÓ et al., 1999).

A infecção por ingestão de alimentos contaminados não parece ter a importância que se observa na brucelose de outras espécies domésticas, mas foi comprovado que a bactéria pode ser recuperada de secreções uterinas de ovelhas até dez dias após o aborto (GIL TURNES, 1998) e a transmissão através de água e pasto contaminados com sêmen e urina de animais infectados tem sido questionada (RIDLER et al., 2000).

As manifestações clínicas mais importantes nos carneiros são a epididimite e ocasionalmente orquite, conseqüentemente com baixo índice de fertilidade e natalidade, aspectos que resultam em eliminação de reprodutores de alto valor genético. Fêmeas apresentam abortamentos e nascimento de cordeiros fracos. No entanto, somente 30% dos machos afetados desenvolvem epididimite, os demais carneiros apresentam testículos e ejaculados de aparência normal, podendo eliminar a bactéria no sêmen de forma intermitente (QUISPE, RIVERA e ROSADIO, 2002; MANAZZA, 2005). Adicionalmente,

carneiros infectados apresentando epididimite palpável podem freqüentemente retornar ao normal à palpação clínica em poucas semanas (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986), porém ao exame histológico haverá lesões no epidídimo ou glândula sexual acessória e o animal continuará disseminando a doença no rebanho (NIELSEN e DUNCAN, 1990).

Quispe, Rivera e Rosadio (2002) relataram uma rápida evolução da enfermidade em condições de campo ao observarem em um plantel de 250 animais, um aumento, ao exame clínico, de 33 e 71 animais clinicamente enfermos em 30 e 60 dias, respectivamente. Estes animais precisaram ser eliminados no final do estudo devido ao grande número de lesões testiculares apresentadas.

O aborto geralmente acontece 30 dias após o início da gestação e os cordeiros que sobrevivem podem ser um potencial portador podendo desenvolver a doença ao atingir a puberdade (ESTEIN, 1999).

Muhammed et al. (1974), relataram que em infecções experimentais de ovelhas o aborto só foi observado no segundo mês de gestação. Este fato demonstra que ainda que a ovelha seja relativamente resistente à infecção ela teria um importante papel na disseminação da enfermidade (HOMSE, CASARO e CAMPERO, 1995) Além disso, durante a estação de monta, a borrega em cio tende a aceitar vários machos e durante esta prática, muitos animais livres de infecção tornam-se infectados (QUISPE, RIVERA e ROSADIO, 2002).

A *B. ovis* não pôde ser isolada da vagina de ovelhas infectadas experimentalmente aos seis dias após a inoculação, porém foi isolada em alguns animais aos três meses de gestação. Bacteremia foi detectada três semanas seguintes à infecção, porém, de forma transitória ou intermitente (MUHAMMED et al., 1974).

Experimentalmente a enfermidade apresenta um período de incubação de aproximadamente 4-6 semanas, após o que, pode-se observar eliminação da bactéria no sêmen. Alterações clínicas são detectadas a partir da 9ª semana pós-infecção (WEBB et al., 1980; QUISPE, RIVERA e ROSADIO, 2002). Carneiros permanecem freqüentemente infectados e muitos eliminam a bactéria no sêmen de modo intermitente por meses a anos (BIBERSTEIN et al., 1963). O uso de carneiros com baixa fertilidade tende a prolongar o período de

estação de monta e aumenta o número de ovelhas não prenhes. O controle da doença no rebanho permite diminuir o número de carneiros utilizados na estação de monta e promove uma melhora no estado reprodutivo (BAGLEY et al. 1984).

Os reprodutores representam aproximadamente 80% da troca genética que ocorre em um rebanho e qualquer falha ou ineficiência no processo reprodutivo pode resultar em drástica diminuição da eficiência reprodutiva das fêmeas (QUISPE, RIVERA e ROSADIO, 2002). O efeito da enfermidade sobre a fertilidade do rebanho pode ser mascarado quando se utiliza uma grande quantidade de reprodutores machos a serviço, uma vez que nem todos os carneiros estão afetados sendo compensados por machos sadios (KOTT et al., 1988; MANAZZA, 2005). O efeito da doença não é realmente aparente em rebanhos extensivos e alguns produtores não estão cientes da importância econômica da doença no rebanho (BAGLEY et al., 1984). A dificuldade no controle da doença se deve ao fato de alguns carneiros infectados não desenvolverem títulos sorológicos, outros não desenvolverem infecção persistente (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986), porém apresentarem títulos sorológicos por muitos meses e o fato de carneiros jovens poderem se infectar e eliminar a bactéria no sêmen (CLEMENTINO, 2005), contribuindo para disseminação da enfermidade, uma vez que se tornam portadores.

O diagnóstico da brucelose ovina geralmente é realizado com a associação de exame clínico, isolamento da bactéria, histórico do rebanho (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986, NÁREZ et al., 1999) e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo (ALTON et al., 1988). A existência de outras bactérias causadoras de epididimite clínica dificulta o diagnóstico clínico apenas por palpação testicular (BLASCO e BARBERÁN, 1990).

Os métodos de diagnóstico indireto são os mais amplamente utilizados sendo a Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) e a Fixação de Complemento (FC) as técnicas mais utilizadas. O IDGA apresenta sensibilidade semelhante à FC e é de mais simples execução. Segundo as normas contidas no projeto de Instrução Normativa que institui o Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para certificação de

propriedades livres ou para fins de trânsito, deverão ser testados machos não castrados, acima de seis meses de idade utilizando-se como teste de rotina o IDGA e como teste confirmatório a FC (NOGUEIRA, 2006).

Diagnósticos indiretos baseados na detecção de anticorpos não são totalmente satisfatórios, principalmente pela presença de animais negativos que eliminam a bactéria no sêmen (BULGIN, 1990, MARCO et al., 1994) e a presença de animais infectados que não desenvolvem títulos sorológicos (MARÍN et al, 1989, HILBINK et al., 1993, PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986, BULGIN, 1990, WEST e BRUCE, 1991).

A dificuldade de se ter um diagnóstico sorológico com boa especificidade e sensibilidade, que possa ser interpretado individualmente, faz com que o diagnóstico para brucelose ovina seja sempre realizado com aplicação de duas ou mais técnicas para um resultado conclusivo, o que às vezes pode ser muito oneroso e demorado.

Apesar da possibilidade do isolamento de *B. ovis* ser realizado de tecidos ou sêmen dos carneiros, descargas vaginais ou leite das ovelhas, o método não permite detectar todos os animais infectados. Animais na fase crônica podem eliminar o agente de forma intermitente, ou mesmo não eliminá-lo (NOGUEIRA, 2006).

A excreção de *B. ovis* no sêmen de carneiros negativos foi reportada por Bulgin (1990). A frequente existência de amostras de sêmen contaminadas com outras bactérias ou contendo baixo número de *B. ovis*, pode justificar o uso do PCR como um diagnóstico direto complementar (MANTEROLA et al., 2003). A técnica de PCR poderia ser um método alternativo para diagnóstico, por ser mais específica, mais sensível e facilmente adaptada para o processamento de um grande número de amostras.

Em vista da literatura consultada a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a patogenicidade e o potencial infectante da *Brucella ovis* REO 198 em carneiros inoculados experimentalmente, estudar o perfil sorológico de carneiros inoculados experimentalmente em diferentes fases da doença, associando com os sinais clínicos e analisando o teste de imunodifusão em ágar gel e teste de soroaglutinação rápida no diagnóstico da enfermidade. Adicionalmente, adaptar e avaliar uma técnica de Reação em

Cadeia pela Polimerase frente ao cultivo bacteriano em diferentes materiais de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis*. Como objetivos específicos seguem-se:

- Analisar os sinais clínicos, o percentual e período de eliminação da bactéria em sêmen e urina dos animais infectados considerando seu potencial como fonte de infecção e associá-los à sorologia dos animais.
- Adaptar e avaliar a técnica de PCR na detecção de *B. ovis* em sêmen, urina e órgãos de ovinos infectados experimentalmente e comparar os resultados obtidos nas técnicas de PCR com o cultivo e isolamento da bactéria.
- Determinar o perfil sorológico após inoculação experimental de ovinos com *B. ovis* utilizando a IDGA e soroaglutinação rápida e associá-los aos sinais clínicos, com vista a caracterizar a eficiência do diagnóstico clínico e dos métodos no diagnóstico da brucelose ovina.
- Avaliar a soroaglutinação rápida como método diagnóstico alternativo para brucelose ovina.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa crônica, na maior parte das vezes de caráter zoonótico, de importância em saúde pública e em saúde animal que acomete quase todas as espécies de animais domésticos, numerosos animais silvestres e o homem. É causada pela *Brucella spp*, bactéria Gram-negativa composta por uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa composta por lipopolissacarídeo (principal antígeno de superfície da maioria das bactérias Gram-negativas) e várias outras proteínas principais. A superfície das bactérias do gênero *Brucella* varia segundo a fase em que se encontram (lisa ou rugosa). Os lipopolissacarídeos das cepas lisas (LPS-S) são constituídos por lipídeos A ou M, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta denominada cadeia O (MORIYON, 1988). O LPS da cepa rugosa (LPS-R) é basicamente similar ao das lisas, exceto pela ausência da cadeia O (BLASCO, 1990).

O agente etiológico da brucelose ovina é *B. ovis*, cepa rugosa e de caráter não zoonótico. Bactéria intracelular facultativa, são cocobacilos Gram-negativos, imóveis, não capsulados, aflagelados, não esporulados que medem 0,4 à 2,5 μ comprimento por 0,4 à 0,8 μ largura, cultivada em ambiente com 5-10% de CO₂. As colônias são visíveis em três a cinco dias de incubação, apresentando-se pequenas, circulares, de bordos regulares, opacas de cor variando do branco ao marrom (ALTON et al., 1988). Nas suas características bioquímicas, *B. ovis* é urease negativa, não reduz nitrato para nitrito, é catalase positiva e oxidase negativa, não produz H₂S e geralmente cresce nas concentrações padrões de tionina e fucsina (NIELSEN e DUNCAN, 1990).

A *B. ovis* e a *B. canis* são as únicas integrantes do gênero que são patogênicas em forma rugosa. A morfologia rugosa confere a propriedade de autoaglutinar em soluções salina e de acriflavina, dificultando sua utilização em reações de soroaglutinação. Tem sido detectado um só tipo de *B. ovis*. Esta espécie apresenta antigenicidade cruzada com a *B. canis*, da qual pode se diferenciar pela ausência de urease. As duas espécies reagem com soros

padrões monoespecíficos para brucelas rugosas, mas não com os soros monoespecíficos contra brucelas lisas (GIL TURNES, 1998).

A relação antigênica entre brucelas rugosas e organismos de outros gêneros não tem recebido a devida atenção, porém há relatos de reações cruzadas entre a *B. canis*, e agentes como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus spp.*; estas reações cruzadas parecem estender-se também para outras brucelas como *B. ovis* (CORBEL, 1985).

A membrana externa de *B. ovis* contém dois grupos de proteínas de membrana que se classificam em maiores e menores e se acham estreitamente unidas ao LPS-R. O primeiro grupo pertencem a proteínas de 36-38 kDa (Omp2b) e são funcionalmente porinas e o segundo grupo são compostos por proteínas de 25-27 kDa e de 31-34 kDa, atualmente denominadas Omp25 y Omp31 respectivamente, as quais se encontram associadas fortemente ao peptidoglicano (ESTEIN, 1999).

A resposta imune humoral em ovinos infectados naturalmente, apresenta-se principalmente contra o LPS-R e contra as proteínas de membrana do grupo três, ambas expostas na superfície da *Brucella* e presentes no extrato salino obtidos por calor (HS). O extrato salino contém determinantes LPS específicos para *B. ovis*, mas também componentes antigênicos adicionais alguns deles com partes lisas e rugosas de outras brucelas (BLASCO, 1990). Animais com epidídimo-orquite, apresentam resposta sorológica mais intensa e dirigida contra um maior número de proteínas que naqueles sem sintomas, devido, provavelmente, a maior estimulação antigênica (ESTEIN, 1999).

A *B. ovis* infecta de forma natural quase exclusivamente a espécie ovina, já sendo demonstrada infecção em cervos (RIDLER et al., 2000). O macho parece ser mais suscetível à infecção que a fêmea (TAMAYO et al., 1989). Por outro lado, a raça Merino é mais resistente à infecção que as raças britânicas e suas cruzas, em condições de exploração similares. Ainda que a resistência genética seja importante, a diferença de precocidade e atividade sexual entre as raças poderia ser um aspecto da diferença na suscetibilidade (ROBLES, 1994, ESTEIN, 1999).

O carneiro é o disseminador ativo da infecção através do sêmen; o macho portador, com ou sem lesões, pode transmitir a enfermidade a outro carneiro diretamente por saltar entre si ou indiretamente através de uma ovelha infectada. Uma mesma ovelha pode ser “coberta” por vários carneiros aumentando ou favorecendo a possibilidade de contágio. Como o sêmen é a principal via de excreção da *B. ovis* (PAOLICCHI et al., 1991) e as mucosas vaginais e cérvico-uterina são importantes portas de entrada do agente (HOMSE, CASARO e CAMPERO, 1995; PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986), a transmissão da *B. ovis* do carneiro para a ovelha na cópula contribui para a manutenção da infecção. Marco et al. (1994), afirmam que a localização da *B. ovis* no útero leva a excreção da bactéria nas secreções vaginais e constitui um risco de infecção para carneiros durante a cópula. Grilló et al. (1999) observaram que ao permitir cinco carneiros livres de infecção por *B. ovis* copularem com ovelhas que excretavam a bactéria nas secreções vaginais, apenas um carneiro soroconverteu, não sendo isolado *B. ovis* de seus tecidos na necropsia.

A transmissão congênita da *B. ovis* foi demonstrada por Grilló et al. (1999), ao infectarem ovelhas na metade da primeira gestação constataram um cordeiro infectado, que morreu no décimo dia de idade.

A transmissão direta de carneiro a carneiro é também freqüente em carneiros com comportamento homossexual (BROWN et al., 1973, NÁREZ et al., 1999, QUISPE, RIVERA e ROSADIO, 2002) podendo transmitir a *B. ovis* através da mucosa retal, porém é mediante a via oral, por meio de lambedura do prepúcio uns dos outros, que se produz a maior parte dos contágios de macho a macho (MANAZZA, 2005). A presença de animais soronegativos que excretam a bactéria no sêmen (BULGIN, 1990, MARCO et al., 1994) também favorece a persistência da infecção no rebanho.

Infecção em caprinos foi demonstrada apenas experimentalmente. Nestes animais a infecção é leve e de curta duração, não sendo verificado, ainda, a transmissão da doença de ovinos a caprinos em condições de campo (ENSTEIN, 1999). No entanto, caprinos infectados experimentalmente reagem sorologicamente e excretam a bactéria no sêmen, da mesma maneira que ovinos infectados (BURGESS et al., 1982).

A transmissão de *B. ovis* de carneiros infectados para cervos não infectados mantidos no mesmo pasto foi observada por Ridler et al. (2000), os quais justificaram a transmissão por meio de lambedura do prepúcio dos animais ou do ambiente contaminado com sêmen ou urina dos animais infectados. Isolamento da bactéria da urina e órgãos genitais de carneiros infectados experimentalmente, já havia sido relatado (CERRI et al., 1999).

Inoculação experimental tem sido realizada em diversos estudos (BIBERSTEIN et al., 1963). Autores observando a patogenia da epididimite em 48 carneiros infectados via conjuntival, relataram que as primeiras lesões se desenvolveram durante o segundo mês pós-inoculação, no epitélio da cauda do epidídimo, vesícula seminal e ampola. As inoculações geralmente são realizadas com cepas patogênicas de *B. ovis* isoladas de animais de campo acometidos pela enfermidade. A *B. ovis* REO 198 é uma cepa mutante, considerada avirulenta e CO₂ independente (GAMAZO et al., 1989), sendo utilizada geralmente na produção de antígenos HS (OIE, 1996). Entretanto, trabalhos de pesquisa relatando o verdadeiro potencial da cepa *B. ovis* REO 198 não foram encontrados.

A brucelose ovina é uma enfermidade cosmopolita, sendo relatada em quase todos os países onde se explora a ovinocultura. Nos países da América Latina, foi descrita no Chile, onde os pesquisadores observaram 2,8% de animais positivos (ROJAS et al., 1990a) e Argentina, com 4,3% de positivos em 345 carneiros avaliados (ROBLES et al., 1993). Neste mesmo país, Draghi-de-Benitez et al. (1984) detectaram 9,4% de positivos em 737 fêmeas e 16% positivos em 1096 machos. No México, Tamayo et al. (1989) avaliaram 166 carneiros e observaram 25,9% de positivos a FC e em 1259 fêmeas, os autores verificaram 3,3% positividade. Em 1997, Torres et al., relataram 2,4% de positivos ao IDGA em 622 carneiros pertencentes a 6 estados mexicanos. No Uruguai, Baigun, Conigliaro e Luna (2000), observaram que em 12 amostras testadas pelo teste imunoenzimático (ELISA) e imunodifusão em gel de ágar (IDGA), dez resultaram positivas, uma suspeita e uma negativa.

No Brasil, a existência da brucelose ovina foi relatada desde algum tempo, conseqüente à aquisição de animais procedentes dos países nos qual a doença já foi diagnosticada (RAMOS et al., 1966). Fernandes et al.

(1966) relataram que a epididimite causada por *B. ovis* foi observada pela primeira vez no Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Sul por Ramos et al. (1966).

Ramos et al. (1966), detectaram através da técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), 6,5% de positivos em 3317 carneiros estudados. A partir desta data, vários estudos sorológicos utilizando a prova de IDGA, têm sido relatados obtendo-se animais sororeagentes em vários estados brasileiros. Nos municípios do estado do RS foi diagnosticado por Bermúdez et al. (1978), em Pelotas, com positividade de 43,5% em carneiros e de 32,8% em rufiões, por Magalhães Neto et al. (1991), com 12% de reatores sorológicos, por Ramos et al (1992a), em Santana do Livramento, com 43% positividade e por Magalhães Neto e Gil Turnes (1996) com soropositividade de 12,6% em carneiros mantidos em condições de campo, 11,7% em rufiões e 17,7% em carneiros mantidos em regime de cabanha.

No estado de São Paulo, Marinho e Mathias (1996) testaram soros de ovinos de 18 rebanhos e não encontraram animais positivos. Nozaki et al. (2002), testando 110 soros de animais de exposição, observaram 12 positivos ao IDGA sem 2-mercaptoetanol (2-ME) e quando submetidos ao tratamento apresentaram-se negativos. Em 2003, estes mesmos autores, avaliando 1033 soros ovinos de cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo, observaram 124 amostras reagentes ao teste, diminuindo para 11 amostras quando submetidas ao tratamento com 2-ME. Devido à presença de resultados discrepantes nas provas sorológicas aplicadas e a ausência de quadro clínico nos animais, não se pôde afirmar que os animais fossem positivos.

Em Santa Catarina, Schäfer et al. (1997), relataram 18,84% carneiros com alterações escrotais de 69 animais examinados, porém nenhum animal apresentou-se positivo à IDGA. No Rio Grande do Norte, Silva et al. (2003), detectaram 256 fêmeas e 34 machos reagentes ao IDGA, sendo 34% positivos de 13 de 14 municípios avaliados e Azevedo et al. (2004), observaram 11,3% reagentes. No Rio de Janeiro, Lima et al. (2007), relataram 13 (3.64%) positivos de 357 soros ovinos de cinco regiões do estado.

A *B. ovis* penetra no organismo através das mucosas conjuntival (GRILLÓ et al., 1999, MANTEROLA et al., 2003), cervico-vaginal

(PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986, HOMSE et al., 1995), prepucial (MANTEROLA et al., 2003, PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986), retal, nasal (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986), oral (ALTON et al., 1988) e através da pele lesada (NIELSEN e DUNCAN, 1990). Após penetração pela mucosa peniana, retal ou vaginal, pode permanecer nelas por um mês, multiplicando-se lentamente, devido a propriedade de resistir à destruição intrafagocitária. O agente permanece confinado nos linfonodos próximos ao local de entrada por 2-3 semanas e então produz-se bacteremia, com distribuição para os órgãos sexuais, baço, rins e fígado, onde, devido à ineficiência dos fagócitos em sua destruição, produzem-se abscessos e reações inflamatórias crônicas, caracterizadas por fibrose e calcificação. A bactéria se multiplica nos órgãos afetados, sendo eliminada à medida que as células infectadas são destruídas (GIL TURNES, 1998). O carneiro infectado constitui o principal reservatório do rebanho, sendo o sêmen fundamental na difusão da doença. A liberação da bactéria no sêmen é intermitente e por períodos prolongados (WORTHINGTON et al., 1985, PAOLICCHI et al., 1993), relatando-se cultivos positivos até 80 semanas pós-infecção experimental (PAOLICCHI et al., 1991).

O desenvolvimento da infecção difere substancialmente na ovelha em relação ao macho. A infecção é caracterizada por epididimite subsequente diminuição de fertilidade em carneiros; em ovelhas, causa abortos ocasionais (BLASCO, 1990; BAIGUN, CONIGLIARO e LUNA, 2000).

Os machos são mais suscetíveis à infecção por *B. ovis* que a fêmea. Tamayo et al. (1989) encontraram 25,9% de machos infectados e 3,3% de fêmeas. Na fêmea não gestante, a *B. ovis* produz vaginocervicite e endometrite, com uma conseqüente infertilidade temporária. Na ovelha gestante, a *B. ovis* produz bacteremia e reaparece no trato genital a partir da segunda metade da gestação, ocasionando placentite e morte fetal ou nascimento de cordeiros com baixo peso (ESTEIN, 1999) e afetados por pneumonia supurativa ou com lesões no rim ou fígado, que impedem sua sobrevivência.

Marco et al. (1994) isolaram *B. ovis* de 16 ovelhas naturalmente infectadas, sendo que em 12 delas a bactéria foi isolada do útero. A infecção experimental de 75 ovelhas via intra-uterina 24 horas após a inseminação artificial resultou na repetição de cio em 36 ovelhas, sendo *B. ovis*

isolada do muco cervical do 16º até o 45º dia pós-infecção (HOMSE et al., 1995).

Estein (1999) relata que apesar da ovelha se recuperar da infecção logo após o parto, ela excreta *B. ovis* através das secreções vaginais e uterinas, placenta e lóquio. Tanto em casos de infecção natural como em infecção experimental, os envoltórios fetais e o feto constituem vias de eliminação da *B. ovis*, uma vez que a bactéria foi isolada a partir do feto e placenta (LIBAL e KIRKBRIDE, 1983; GRILLÓ et al., 1999).

A infecção dos cordeiros pode ocorrer após o nascimento, ao mamarem leite de mães infectadas (BAIGUN, CONIGLIARO e LUNA, 2000). Entretanto, Grilló et al. (1999) não conseguiram isolar *B. ovis* de 46 cordeiros que mamaram leite de ovelhas infectadas.

A infecção por *B. ovis* tem sido demonstrada em muitos carneiros jovens, sugerindo que estes animais logo após a puberdade poderiam ser altamente suscetíveis a *B. ovis*. Os animais adultos são comumente os mais infectados naturalmente. De fato, tem-se observado que a incidência de alterações testiculares e sorologia positiva para brucelose aumentam com a idade e com a atividade sexual do animal (FICAPAL et al., 1998). Hajtkos et al. (1987), observaram casos de epididimite causada por *B. ovis* em carneiros maiores de dois anos de idade, enquanto nos animais mais jovens era observado epididimite por *Histophilus ovis* e *Actinobacillus seminis*. Segundo o autor, este último agente pode apresentar reação sorológica cruzada com *B. ovis*.

Inoculação experimental tem sido realizada em diversos estudos, Biberstein et al (1963), estudando patogenia da epididimite em 48 carneiros infectados via conjuntival, observaram que as primeiras lesões se desenvolveram durante o segundo mês pós-inoculação, no epitélio da cauda do epidídimo, vesícula seminal e ampola. Após dois meses, observou-se bacteremia com localização em outros órgãos, incluindo fígado, baço e rim. Anticorpos foram primeiramente detectados, através da técnica de fixação de complemento (FC), no nono dia depois da infecção e estavam presentes em todos os animais depois da terceira semana, persistindo durante 255 dias de experimento.

Na fase inicial da infecção observa-se diminuição da qualidade do sêmen que apresenta, além disso, glóbulos de pus e o agente causal. A seguir aparecem os sintomas de uma inflamação aguda, com edema do escroto, da vulva, do epidídimo ou do testículo, simultaneamente com febre, enfraquecimento e taquipnéia (RAMOS et al., 1966) A epididimite pode ser unilateral ou, ocasionalmente, bilateral (CFSPH, 2007). Desenvolvimento de granulomas espermáticos pode ocorrer, em um ou ambos os epidídimos (PÉREZ et al., 1979, PAOLICCHI et al., 2000). Estas lesões mais comumente evoluem a cauda do epidídimo e podem ser detectadas por palpação do conteúdo escrotal (HUGHES E CLAXTON, 1968). Há observação também de uma reação inflamatória intersticial levando a epididimite, vesiculite seminal, ampulite e fibrose epididimal (NÚÑEZ-TORRES et al., 1998), degeneração e mineralização testicular (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986; WEST et al., 1993; PAOLICCHI et al., 2000).

Na fase crônica, as lesões podem ser determinadas pela palpação do epidídimo e da vulva, formando-se espermatocele, fibrose e aderências que obliteram, por vezes, a cavidade vaginal (RAMOS et al., 1966). Atrofia testicular em graus variáveis e aumento no volume do epidídimo são características da infecção crônica (BLASCO, 1990). Entretanto, apesar de muitos carneiros infectados desenvolverem lesões palpáveis, algumas lesões podem regredir a ponto do animal ser considerado clinicamente normal (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986). A bactéria apresenta tropismo pelos órgãos genitais sendo isolada da ampola dos ductos deferentes, vesícula seminal, glândula bulbo uretral, epidídimos e testículos (WORTHINGTON et al., 1985; PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986; WEST et al., 1993).

No carneiro, as lesões resultantes da infecção por *B. ovis*, com confirmação bacteriológica, se concentram principalmente na cauda do epidídimo, mas também na ampola do ducto deferente e na glândula vesicular, sendo que 70% dos casos a lesão é bilateral (SEARSON, 1987). Células inflamatórias aparecem no sêmen duas a oito semanas depois, nos animais infectados e a qualidade do sêmen é inferior; as lesões palpáveis no epidídimo desenvolvem-se aproximadamente nove semanas pós-infecção (DEFRA, 2001). Porém, alguns animais que apresentam lesões palpáveis dos órgãos genitais, podem eliminar sêmen com aparência normal. Ramos et al. (1966), no

RS, detectaram 6,5% de positivos à IDGA, sendo 10,8% com lesões palpáveis e 11,5% dos que apresentaram lesões, com sêmen de aparência normal, 55,7% com azoospermia, 26,8% com oligozoospermia e 5,7% com necrospermia.

Alterações palpáveis foram observadas em 48 (39,7%) de 121 carneiros com títulos na FC e em 32 (36,4%) de 88 carneiros com isolamento positivo, sendo que 16 destes com isolamento positivo não haviam desenvolvido lesão palpável seis meses após a bactéria ser isolada no sêmen (HUGHES E CLAXTON, 1968). Nárez et al. (1999), observaram sorologia positiva ao IDGA e ELISA em 35 (31,53%) animais. Destes, 25 (22,5%) não apresentaram alterações testiculares aparentes e 10 (9%) apresentaram orquite ou epididimite quando submetidos ao exame clínico.

Epididimite uni ou bilateral é a alteração mais freqüente observada entre as patologias clínicas, sendo relatado em carneiros experimentalmente infectados, com presença de atrofia do testículo do lado afetado na 4^a-12^a semanas pós-inoculação (PLANT, EAMENS e SEAMAN, 1986) e em carneiros descartados de programas de reprodução. Fato este, verificado por Foster et al. (1988), em 845 carneiros descartados de 17 fazendas australianas, na qual observaram que a maioria dos animais que apresentavam epididimite foram também sorologicamente positivos para *B. ovis*.

O efeito da brucelose ovina na qualidade do sêmen vem sendo estudado em carneiros infectados artificialmente. Presença de células inflamatórias em amostras de sêmen de dois carneiros infectados experimentalmente há duas semanas pós-inoculação e em todos os 10 carneiros após oito semanas, foi verificado por Webb et al. (1980), na qual conseguiram isolamento da *B. ovis* em sêmen de cinco carneiros quatro semanas após a infecção e em todos os carneiros a partir da quinta semana. Todos os animais desenvolveram títulos significantes para FC entre duas e nove semanas, mas títulos flutuantes foram observados em várias semanas. Afzal et al. (1986), realizando inoculação experimental de *B. ovis*, para medir a resposta imune, isolaram a bactéria do sêmen de cinco dos seis carneiros inoculados e em todos os cinco foi observada a presença de grande quantidade de leucócitos no sêmen.

A *B. ovis* também afeta a concentração espermática, resultando em redução total na produção de esperma, baixa motilidade e alto percentual de anormalidades morfológicas. Casos de aspermia em carneiros sem manifestações clínicas detectáveis também foram relatados (CAMERON e LAUERMAN Jr., 1976).

As anormalidades mais frequentes são cabeças isoladas, cauda curvada e cauda dobrada (CARDOSO et al., 1989). Freitas et al. (1980), verificaram que carneiros com epididimite por *B. ovis* apresentaram 70% dos espermatozoides com defeito de cabeça destacada e 73% com defeito de cauda. Na observação de espermiogramas de um grupo de animais sorologicamente positivos, foram detectados, 70% de espermatozoides normais, 10% com cabeça isolada, 4% com defeitos de cabeça, 10% com defeitos de cauda e 6% com outros defeitos. No grupo sorológico e clinicamente positivo 50% dos espermatozoides foram normais, 25% apresentavam cabeças isoladas, 4% defeitos de cabeça, 11% defeitos de cauda e 10% apresentavam outros defeitos (MAGALHÃES e GIL TURNES, 1996).

Resposta anti-espermática em carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis*, foi estudada por Paolicchi et al. (2000), os quais observaram alterações genitais em 71,4% dos animais inoculados. Lesões epididimais consistiram em múltiplas massas caseosas e cistos com conteúdo purulento. *B. ovis* foi isolada de 57% das culturas de sêmen e recuperada de 75% dos tecidos genitais de carneiros inoculados via conjuntival e intraprepuccial.

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado com a combinação de exame clínico, isolamento da bactéria em amostras de sêmen, tecidos, descargas vaginais e leite de animais infectados (WEBB et al., 1980, GRILLÓ et al., 1999, BAIGUN, CONIGLIARO e LUNA, 2000) e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo (ALTON et al., 1988).

As medidas de controle da enfermidade tendem a identificação e eliminação de animais sorologicamente positivos e/ou com epididimite clínica, evitando a introdução de animais infectados. Consequentemente, os machos devem ser palpados antes da estação de monta e sangrados uma vez por ano (ESTEIN, 1999). Alguns autores

recomendam a implantação do cultivo bacteriológico do sêmen como complemento ao exame clínico e realização de testes sorológicos antes da estação de monta (PAOLICCHI et al., 1992). Porém os métodos clínicos e bacteriológicos não são adequados para a detecção da doença em um número muito grande de ovinos, porque ambos os métodos falham ao detectar todos os animais infectados. A existência de outras bactérias causadoras de epididimite clínica e a presença de carneiros infectados sem sinais clínicos dificultam o diagnóstico apenas por palpação testicular (BLASCO e BARBERÁN, 1990, RUELAS e ROSADIO, 1999, JANSEN, 1980, VAN TONDER, 1982, LOZANO, 1986, MYERS, 1973, KOTT, 1988).

A presença de animais positivos aos testes sorológicos e negativos ao isolamento é explicada dada à forma intermitente de eliminação da *B. ovis* e sua baixa concentração no sêmen (WORTHINGTON et al., 1985, BAIGUN, CONIGLIARO e LUNA, 2000), o que dificulta seu isolamento. Por isso, é recomendado o processamento de amostras seriadas para aumentar a possibilidade de êxito (BLASCO e BARBERÁN, 1990). Em função das dificuldades de isolamento do agente bacteriano, as provas sorológicas desempenham papel importante no diagnóstico da enfermidade (CARMICHAEL e GREENE, 1998), entretanto, observação de animais negativos aos testes sorológicos, eliminando a bactéria no sêmen, já foram descritos (BULGIN, 1990, MARCO et al., 1994), assim como, animais com títulos flutuantes às provas sorológicas (WEBB et al., 1980).

Vários métodos sorológicos são utilizados para detectar anticorpos contra *B. ovis* incluindo IDGA, FC (WORTHINGTON et al., 1985, MARÍN et al., 1989, HILBINK et al., 1993, ROBLES, 1998), hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta, ELISA (VIGLIOCCO et al., 1997) e a soroaglutinação rápida (SAR).

A IDGA baseia-se na formação de complexo antígeno-anticorpo que se insolubiliza e precipita no gel, podendo ser visualizado sob a forma de linha de precipitação; apresenta sensibilidade variando em torno de 91,7% a 100% e especificidade de 100%, sendo de fácil execução e interpretação (WORTHINGTON et al., 1985, MARÍN et al., 1989, ROBLES, 1998 e GIL TURNES, 1998).

Koerich e Vaz (2002), comparando antígenos (Ag) utilizados no diagnóstico de *B. ovis*, para verificar se há diferenças entre padrões de bandas em eletroforese em gel de poliacrilamida, relataram que a utilização de Ag de diferentes origens no diagnóstico, podem levar a diferenças quanto a reação produzida, mesmo quando utilizava a mesma cepa bacteriana e a mesma técnica de produção. Observaram uma variação na concentração protéica, levando ao aparecimento de linhas de precipitação extra, devido a diferença na quantidade de proteínas, dificultando os resultados dos diagnósticos. Os Ag para *B. ovis* atualmente produzidos, apresentam uma variabilidade entre partidas, para estes autores isto gera dificuldades para padronização de diagnóstico e inibe a produção comercial destes antígenos.

Os testes de IDGA geralmente utilizam antígeno de extrato salino, constituído por lipopolissacarídeos rugosos e proteínas componentes da membrana externa da *Brucella* (OIE, 1996) ou antígeno citoplasmático para detecção de *B. ovis*, e são capazes de detectar a presença de anticorpos a partir da 6^a ou da 12^a semana após a infecção, podendo os mesmos persistir por muitos anos (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992). Entretanto, o antígeno de parede celular não é exclusivo para *B. ovis*, pois agentes como *B. canis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e algumas espécies de *Staphylococcus* mucóide possuem antígenos similares. Portanto, os testes sorológicos para *B. ovis* que usam antígeno de parede celular não são específicos para essa infecção. Os anticorpos produzidos contra antígenos comuns podem apresentar reações cruzadas no teste, gerando resultados falso-positivos e, na maioria dos casos, esses microrganismos raramente são identificados (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

A IDGA utilizando antígeno protéico citoplasmático é altamente específico para a infecção por *B. ovis* ou *B. canis*, já que esse antígeno é comum apenas entre as bactérias do gênero *Brucella* (CARMICHAEL, ZOHA e FLORES-CASTRO, 1984; JOHNSON e WALKER, 1992), contudo, a sensibilidade é baixa do início da 8^a até a 12^a semana de infecção, sendo o teste hábil em detectar infecção crônica (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992).

Entre os métodos utilizados para detectar anticorpos anti-*B. ovis*, o ELISA tem demonstrado ser o mais sensível e específico, permitindo o processamento de um grande número de amostras, porém para realização da técnica é necessário um leitor de placas, a estimativa dos resultados é complexa e não há uma chave de interpretação internacional (WORTHINGTON et al., 1985, MARÍN et al., 1989, ESTEIN, 1999). Adicionalmente, a hemólise e a anticomplementariedade do soro não afetam a reação (ESTEIN, 1999).

Marín et al. (1989) observaram que alguns carneiros infectados com *B. ovis* examinados pelas técnicas de IDGA e FC, foram negativos à IDGA e positivos à FC e vice-versa. Por esta razão, indicaram a utilização de ambos os testes para o diagnóstico confirmatório. Além disso, comparando IDGA, FC e ELISA para *B. ovis* usando diferentes extratos antigênicos, constataram melhor sensibilidade com ELISA (97,6%), seguida da IDGA (96,4%) e do teste de FC (92,7%), sendo que a IDGA detectou duas amostras positivas que resultaram negativas ao ELISA. Todos os testes apresentaram 100% de especificidade, quando se utilizou amostras de soros de carneiros livres de *B. ovis*.

A comparação de IDGA, FC e ELISA, utilizando antígeno protéico de extrato salino, demonstrou melhor resultado individual para o teste de ELISA, entretanto, alguns soros testados foram positivos na IDGA, porém, negativos ao teste de ELISA (BLASCO, 1990). Os melhores resultados tem-se obtido pela combinação da IDGA e ELISA, com sensibilidade de 100%.

Sensibilidade de 97,1% foi observada na IDGA realizada em soros de 69 carneiros infectados naturalmente com *B. ovis* e especificidade de 100% foram obtidos com 200 amostras de soros de carneiros de propriedades livres de *B. ovis* (ROBLES, 1998).

Ficapal et al. (1998) observaram um aumento de 55,1% na sensibilidade, quando os resultados aos testes de IDGA e FC foram avaliados juntos. Além destas técnicas, também tem adquirido bastante destaque o ELISA indireto (RAHALEY et al., 1983; CHO e NILO 1987, WEST et al., 1993).

Na tentativa de sanar as dificuldades encontradas no isolamento da *B. canis*, George e Carmichael (1978), desenvolveram e padronizaram uma SAR para detecção da brucelose canina, com culturas de células de *B. ovis* mortas e coradas e basearam-se na existência de uma

identidade antigênica entre estas duas espécies de *Brucella*. A SAR detecta anticorpos entre 4 a 8 semanas após a infecção e utiliza, geralmente, antígenos de superfície bacteriana. Como diagnóstico de *B. ovis*, tem sido utilizada somente em pesquisas, apresenta a vantagem de ser uma técnica altamente sensível, rápida e de fácil realização (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

López et al. (2005), utilizando uma cepa variante de *B. canis* menos mucóide (*B. canis* M -) como antígeno em um teste de soraglutinação rápida e ELISA-indireto para detecção de *B. ovis* em soros de ovinos, observaram que em 142 soros de rebanhos suspeitos, 46 eram negativos e 56 positivos em todos os testes. Dezesseis foram positivos aos testes de SAR, ELISA-*B. canis* e ELISA-*B. ovis*, 20 positivos somente com a SAR e dois positivos somente em ambos ELISAs. Os autores afirmam que a SAR utilizada, neste caso, poderia ser uma prova substituta da IDGA em amostras de grande escala e ambos os ELISAs poderiam ser utilizados como testes confirmatórios.

A dificuldade de se ter um diagnóstico sorológico com boa sensibilidade que possa ser interpretado individualmente, faz com que o diagnóstico para brucelose ovina seja sempre realizado com aplicação de duas ou mais técnicas para um resultado conclusivo, o que às vezes pode ser muito oneroso e demorado (GIL TURNES, 1998).

A utilização de técnicas de biologia molecular, como a PCR, tem facilitado o diagnóstico direto, uma vez que detecta o DNA do agente, dispensando assim, a utilização de técnicas demoradas como o isolamento bacteriano ou técnicas cujos resultados são duvidosos e não confirmatórios, como os métodos sorológicos. A técnica de PCR é altamente sensível, específica e de rápida realização, tem sido utilizada na detecção de *Brucella* em diferentes amostras como soro, sangue, leite, sêmen e órgãos de animais suspeitos (KEID et al., 2004, O'LEARY, SHEAHAN e SWEENEY, 2006, HAMDY e AMIN, 2002, ROMERO e LOPEZ-GONI, 1999, MANTEROLA et al., 2003, SAUNDERS et al., 2007, CORTEZ et al., 2001) e várias regiões do genoma de *Brucella* tem sido identificados e utilizados nos testes de PCR, como o IS6501 (BRICKER e HALLING, 1994, MANTEROLA et al., 2003), o 16S rRNA (HERMAN e De RIDDER, 1992, ROMERO et al.,

1995), a proteína de membrana externa de 31KDa (BAILY et al., 1992, GALLIEN et al., 1998) e proteínas de membrana externa de 43KDa (FEKETE et al., 1990).

Bricker e Halling (1994), desenvolveram uma PCR que se baseava no gene IS711, comum às espécies de *Brucella*, constituída por cinco primers de oligonucleotídeos, que foi capaz de identificar três biovars de *Brucella abortus*, *B. melitensis*, biovar 1 de *B. suis* e de *B. ovis*.

Entretanto, atualmente, não existe uma PCR que seja específica para *B. ovis*, o que representa um grande problema em áreas onde *B. melitensis* não seja endêmica. Um elemento de inserção da sequência de *B. ovis*, denominado IS6501, apresentou 836pb da sequência de nucleotídeo e ocorreu 20-35 vezes no genoma de *B. ovis* e 5-15 vezes em outras espécies de *Brucella* (Ouahrani et al., 1993). A avaliação de uma PCR para diagnóstico de *B. ovis* utilizando primers designados para a sequência de nucleotídeo da *Brucella* IS 6501, foi verificada por Manterola et al. (2003), em 14 carneiros infectados experimentalmente, na qual, observaram três, quatro, sete e nove amostras positivas no cultivo, na 4ª, 5ª, 6ª e 8ª semana pós-inoculação; respectivamente. A técnica de PCR demonstrou sensibilidade de 51,9% em relação à cultura de sêmen de animais infectados, que foi de 50%. Os autores relatam que a baixa sensibilidade da técnica de PCR pode ser devido a eliminação intermitente de *B. ovis* no sêmen, o que também explica o fato de alguns animais soropositivos apresentarem cultura de sêmen negativos. Entretanto, quando avaliados swabs de sêmen de controles negativos de carneiros livres de *Brucella* sp., as amostras apresentavam-se sempre negativas, indicando a alta especificidade relatada. Um multiplex PCR, capaz de detectar *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis* em sêmen de carneiros, foi desenvolvido utilizando-se os mesmos pares de primers citados por Manterola et al. (2003). O teste foi igualmente sensível para detecção de *A. seminis* em sêmen obtidos de centrais de inseminação e sêmen fresco, entretanto, houve um decréscimo de 10% na sensibilidade de detecção de *B. ovis* e *H. ovis* em sêmen fresco quando comparado com sêmen de centrais de inseminação (SAUNDERS et al., 2007).

A técnica de PCR pode ser um método adequado para caracterizar a eliminação de *B. ovis* no sêmen de reprodutores, evitando a transmissão da enfermidade. Adicionalmente pode se constituir em, a exemplo do que ocorre com outras enfermidades de reprodutores como rinotraqueíte infecciosa bovina, um método rápido de detecção do agente no sêmen destes animais.

A instrução de serviço Nº 07/78 do Ministério da Agricultura, que normatiza os requisitos sanitários mínimos para participação de animais em exposições, feiras e outras aglomerações, exige para ovinos e caprinos atestado de exame negativo à soroaglutinação contra brucelose, tanto pela técnica rápida ou lenta ou pelo card test (BRASIL, 1978), técnicas que não detectam animais infectados por *B. ovis* (SUAREZ et al., 1988).

De fato, a brucelose ovina continua sendo uma doença de expressiva importância, em cujo controle não tem havido progresso, desde que foi diagnosticada no Rio Grande do Sul (MAGALHÃES NETO e GIL TURNES, 1996). Devido à possibilidade de infecções subclínicas por *B. ovis*, recomenda-se que para um animal ser considerado negativo, além do exame clínico deve ser realizado um exame sorológico (FC, IDGA, ELISA) e/ou bacteriológico de sêmen. A IDGA, considerada de alta sensibilidade e especificidade (HILBINK et al., 1993), é um teste de fácil execução pelos veterinários com recursos limitados de laboratório, que permite a detecção de portadores antes de seu ingresso na reprodução, medida de controle essencial que tem demonstrado sua eficácia no controle da doença (BURGESS, 1982).

Tendo em vista que o tratamento da infecção por *B. ovis* não é totalmente efetivo, pois a bactéria pode permanecer, nos órgãos genitais, mesmo após tratamento com altas doses de antibióticos por períodos prolongados, e considerando também que as lesões não regredem para o estado normal e a fertilidade do rebanho fica prejudicada, o conhecimento da epidemiologia da enfermidade, a identificação e eliminação dos carneiros soropositivos e/ou com lesões genitais deve ser a base para impedir a perpetuação da doença no rebanho (CLEMENTINO, 2005).

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Pathogenicity and infective potential of *Brucella ovis* REO 198 in rams inoculated experimentally

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the pathogenicity and infective potential of *B. ovis* REO 198 in rams inoculated experimentally. Clinical signs, percentage of shedding and the period of elimination in semen and urine of infected animals were evaluated, focusing its potential as a source of infection. In the study, 10 rams were submitted to conjunctival and intrapreputial simultaneous inoculation with a solution containing 2×10^9 CFU/mL *B. ovis* REO 198 and five animals received, by the same routes, sterile saline solution and formed the control group. After inoculation, animals were submitted to clinical evaluation and collection of blood for serology every week. Positive serology was observed beginning in the 3th week, and fluctuations in titers were detected. Clinical alterations began in the 5th week after inoculation and were associated with positive serology in the acute phase of the disease. *B. ovis* was observed in semen culture of eight animals and in urine culture of seven animals, in an intermittent manner. Natural infection was observed in three non-inoculated animals that occasionally contacted animals of the experimental group. These animals showed increase in size and hardening of the epididymis, as well as increased size of the testicle. Positive serology was only observed in two animals at 30 days and four months. Shedding of the bacteria in semen was observed twice, at four and six months, in one animal that was serologically negative. The infective and pathogenic potential of the strain was demonstrated by the development of clinical signs in animals experimentally and naturally infected, shedding in urine and semen and development of positive serology. The pathogenic and infective characteristics of *B. ovis* REO 198 were highlighted, as well as the importance of animal excretion as routes of elimination, and the condition of the animals as potential sources of infection.

Key words: *B. ovis* REO 198, brucellosis, ovine, clinical signs, experimental inoculation, epidemiology

INTRODUCTION

Brucella ovis is the etiological agent of ovine brucellosis. It is a Gram-negative, facultative intracellular bacterium that naturally and exclusively infects ovine¹, producing a clinical or subclinical chronic disease characterized by epididymitis. The disease causes a subsequent decrease of fertility in rams, although libido remains normal². It is also responsible for inflammatory processes in accessory sex glands and testicles, reducing semen quality and making some animals sterile. Effects on herd fertility will depend on the number of rams affected and the severity of the lesions in infected animals³. Males are generally more susceptible than females⁴.

B. ovis shows tropism to genital organs, causing epithelial hyperplasia and formation of cysts. Besides, the interstitial inflammatory reaction causes epididymitis, seminal vesiculitis, ampullitis, epididymal fibrosis^{5,6}, testicular atrophy and degeneration⁷.

Most important clinical manifestations in rams are epididymitis and decrease in fertility due to low semen quality. These factors are used in the diagnosis and serve as basis for culling rams of high genetic value. However, not all the animals show testicular lesions⁸: epididymitis affects only 30% of the infected rams. The rest of the animals show normal testicles and ejaculates of normal appearance, and become sources of infection due to the intermittent shedding of the bacteria in the semen⁹. Elimination in urine has been demonstrated to be as efficient as in semen and genital secretions^{10, 11}. However, there are no studies showing when shedding in urine occurs³.

The acute phase of the disease is characterized by a decrease in semen quality, acute inflammation with edema of the scrotum, epididymis or testicles¹². Testicular atrophy in variable degrees, epididymal fibrosis and adhesions are characteristic of the chronic infection¹³.

Diagnosis of *B. ovis* infection is based on the combination of clinical examination, isolation of the bacteria in samples of semen, tissues, vaginal discharges and milk of infected animals^{14, 15} and detection of antibodies anti-*B.*

ovis in blood serum¹⁶. Definitive diagnosis is given by the isolation of the bacteria. However, due to its intermittent elimination, and sometimes, its low concentration in semen, serial samples have to be analyzed in order to increase the possibility of success^{17, 18}.

Eradication programs for the disease are based on serology of the animals and on culling the positive ones. These programs are facing barriers due to the fact that some animals do not show serological titers, although they actively shed the bacteria^{2, 19}; some animals show positive serology with no bacteriological or pathological evidence; and young animals may get infected and shed bacteria in the semen^{8, 20}. Besides, asymptomatic animals may shed the bacteria intermittently^{2, 9, 21}.

Experimental inoculation was carried out in several studies²². Authors who observed the pathogeny of epididymitis in 48 rams infected by conjunctival route reported that the first lesions appeared in the second month after inoculation, affecting the epithelium of the epididymis tail, seminal vesicle and ampulla. Experimental inoculation is generally based on pathogenic *B. ovis* strains isolated from animals affected by the disease in field conditions. *B. ovis* REO 198 is a mutant strain considered to be non-virulent and CO₂ independent²³. It is generally used in the production of HS antigens²⁴. But according to some authors to *B. ovis* REO 198 has severe power for evasive rams cells^{25, 26}. Studies reporting the actual potential of *B. ovis* REO 198 were not found.

Consequently, the objectives of the present study were to evaluate the pathogenicity and infective potential of *B. ovis* REO 198 in experimentally inoculated rams, as well as to observation the clinical signs, percentage and duration of bacterial shedding in the semen and urine of infected animals and to associated these data with serology results.

MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out in the Department of Hygiene Veterinary and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science , UNESP-Botucatu- SP, Brazil.

Inoculum: A lyophilized *B. ovis* REO 198 strain was used. It was obtained in the Center Search Veterinary “Desidério Finamor”. FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS, Brazil.

Animals: Fifteen rams, 1 to 2 years of age, were used. A suspension containing 2×10^9 CFU/mL *B. ovis* was administered to 10 animals, 2mL by intrapreputial route and 50 μ L by intraconjunctival route, simultaneously. The other five animals received sterile saline solution, 2mL by intrapreputial route and 50 μ L by intraconjunctival route, simultaneously, and formed the control group. Before inoculation, blood samples for serological analysis were collected from all animals, as well as semen and urine samples for culture and PCR for *B. ovis*, with negative results. After inoculation, blood for serology and urine and semen for bacterial culture and PCR were collected every week. Inoculated animals were kept free in pastures, simulating natural field conditions of a sheep herd.

Semen collection: Semen from each animal was collected by means of electroejaculation²⁷.

Urine collection: Urine samples were collected every week for microbiological culture and PCR by blocking the breath of the animal for 30 seconds to one minute. After that, the animal urinated spontaneously.

B. ovis culture and isolation: Culture of the samples was carried out on the same day of collection. Semen and urine of all animals were cultured in plates containing modified Thayer-Martin agar and Brucella blood agar²⁸. Plates were incubated at 10% CO₂, for approximately 3-7 days, at 37°C. Suspect colonies were identified by Ziehl-Neelsen and Gram stains, positive urease test and catalase test, negative oxidase test, absence of H₂S production, nitrate reduction test and growth in the presence of thionine and basic fucsine²⁹.

Agar gel immunodiffusion (AGID): A kit for agar gel immunodiffusion with *B. ovis* antigen was used. The kit was made up of bacterial cell wall, produced by Center Search Veterinary “Desidério Finamor”. Gel was prepared according to the instructions of Institute Technology of Parana – TECPAR, using gel 1% in borate buffer, and positive and negative control sera. Reaction was carried out at 25°C in a dark chamber, and reading was performed in 24, 48 and 72h.

RESULTS

Figure 1 shows the serological profile and the development of clinical signs during the study. Antibody titers were detected by AGID in all animals in the third week after inoculation, decreasing soon after the 5th week, and remaining variable as time passed. Peaks of positivity were observed from 22nd week to the 23rd week.

Clinical signs in experimentally infected animals was mainly characterized by the increase in size, increase in consistency and hardening of the organ, with some animals showing testicular lesions or even unilateral epididymis atrophy. These changes were observed in a growing frequency in the animals, starting in the 5th week after inoculation, with a peak between the 10th and the 12th weeks (100%), and decreasing soon after the 14th (20%) week. A new peak was observed from the 16th and 20th weeks (100%), quickly decreasing after the 24th week. After the 10th week, all animals showed clinical changes, with testicular lesions observed in 10% of the population (one animal). After the 16th week, animals started to show sporadic epididymis atrophy.

From the five animals of the control group, natural infection was observed in three of them (60%), caused by occasional contact with the experimental group due to unexpected agglomeration when animals were trying to escape. These animals showed increase in size and hardening of the epididymis, as well as increased size of the testicle. These changes began two months after the inoculations, the variable forms and stopped six months after inoculation. Positive serology was only observed in two animals at 30 days and four months. Shedding of the bacteria in semen was observed twice, at four and six months, in one animal that was serologically negative.

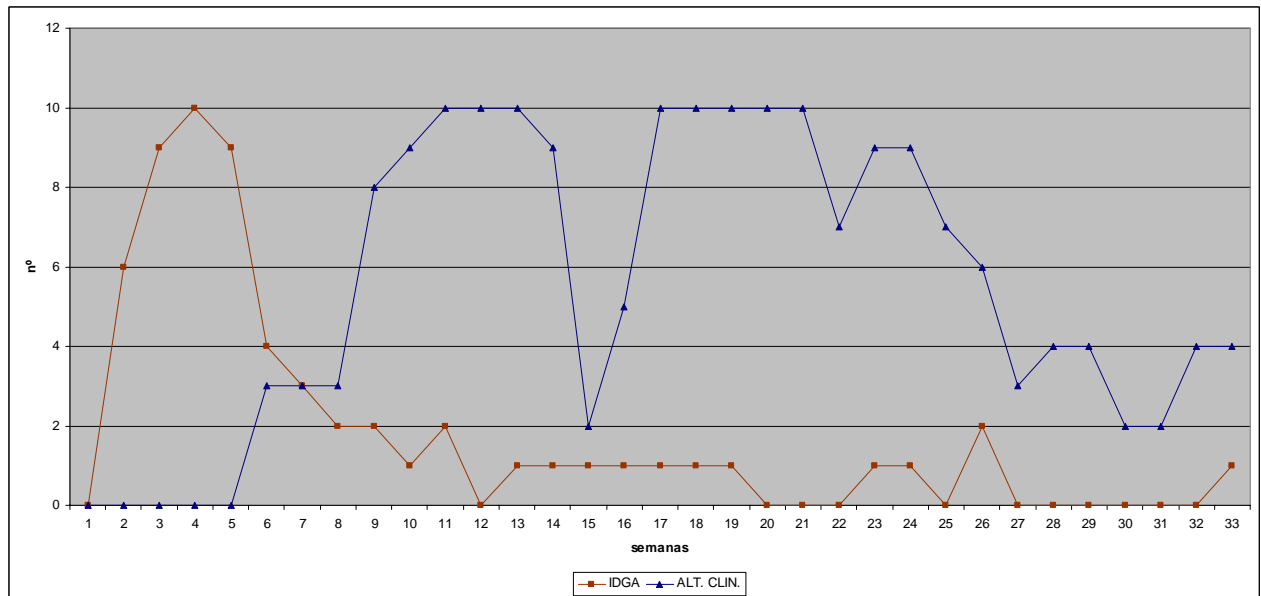


FIGURE 1. Number of positive animais associated to the number of animals with clinical signs in experimentally inoculated animals with *B. ovis* REO 198

Shedding of the bacteria in semen was intermittent during the study in eight animals (80%), mainly occurring from three to seven months after inoculation. Shedding of the bacteria only once was observed in five (50%) animals beginning at three and seven months. Shedding occurred twice in two (20%) animals between four and seven months, and three times in one (10%) animal between four and seven months.

B. ovis shedding in urine was observed in seven animals (70%) between 15 days and eight months after inoculation. Shedding of the bacteria only once was observed in three (30%) animals beginning at 15 days and lasting for four months. Four (40%) animals shed the organism twice between 15 days and eight months.

DISCUSSION

Titer development began in the first week after inoculation and remained variable during the trial, with titer fluctuations during the period of study. Similar results, using *B. ovis* strains considered to be pathogenic, were observed in 10 animals inoculated experimentally by intrapreputial route. In another report serum titers were observed beginning in the 2nd week after inoculation with presence of fluctuating titers in some animals³⁰. Results were also similar to those of other researchers who, using complement fixation test, observed the development of titers at 2-9 weeks after inoculation in 36/41 animals inoculated

experimentally. These authors observed that titers generally developed earlier in animals that were exposed by intrapreputial route, when compared with other routes⁵, supporting the occurrence of positive results since the first week in the present study.

Clinical changes were observed in all animals experimentally inoculated with *B. ovis* REO 198, as well as in the animals that were naturally infected. Changes began in the 5th week after inoculation. However, the greatest number of animals showing clinical changes was observed in the 9th week, with periods of decrease. Titers remained very high until the 24th week, though. Similar results using *B. ovis* strains considered to be pathogenic were reported by other authors, with the detection of clinical lesions in all animals after three weeks of inoculation, lasting for eight weeks³⁰. Changes shown by the animals in the acute and chronic phases of the disease were variable, with return to normal conditions after some weeks. These results are similar to studies that reported that infected animals showing palpable epididymitis may frequently become normal at palpation in few weeks^{12, 13, 18}.

In the present study, shedding of the bacteria in semen was observed in the cultures of eight (80%) animals, from three to seven months after inoculation. Lower percentages were reported in 25 animals submitted to preputial instillation of semen from rams infected with *B. ovis*. From these, only six (24%) animals shed the bacteria five weeks after exposure³¹.

Intermittent shedding of the bacteria for two or more times was observed in the semen of three animals and in the urine of four animals. Changes in the shedding pattern observed in samples of the same animal reinforce the idea that *B. ovis* elimination in semen samples is intermittent. This fact has already been reported, with the intermittent isolation of *B. ovis* in semen samples of infected animals¹⁸.

In the present study, it was observed that it took one animal up to seven months to shed the organism in semen. These results are similar to those reported for 42 infected rams; two of them had never shed the bacteria in semen during 10 months of study and another animal had never shed it for four months³².

Negative serology with excretion of the bacteria in semen was observed in one animal, similar to reported by other authors^{2, 19} reinforcing the importance

of the epidemiological chain of seronegative animals shedding the bacteria in semen.

In urine samples, shedding was observed in seven (70%) animals, from 15 days to four months, at four months and from seven to eight months, in an intermittent manner. This fact points out for the importance of urine as a vehicle for the transmission of the disease, with a greater percentage of animals shedding it from 15 days to four months and one of them only shedding it in urine. Several authors showed the importance of this chain of transmission, mainly due to the contamination of pastures and water sources^{10, 11, 33}.

Based on the results obtained, shedding of the bacteria in the semen and urine of infected animals was intermittent, beginning in 15 days and continuing during the eight months of the study. Thus, the importance of the excretion of these animals as routes of elimination and their condition as potential sources of infection was highlighted. This intermittent shedding of the bacteria may also complicate the diagnosis, once microbiological culture may be negative.

After experimental inoculation, antibodies were detected in the 1st week and remained detectable in a variable percentage (10-20%) until the 18th week. They then decreased with maximum negativity and positivity equal to 20%, different from the clinical signs, that reached 100% of the animals, with peaks between the 11th and 13th and between the 16th and 20th weeks, keeping in 10-20% in the final phase of the study.

The development of clinical signs, humoral immune response and elimination of *B. ovis* REO 198 in urine and semen of animals experimentally inoculated, associated with the development of the disease naturally in casual contacting ovine shows the infective and pathogenic characteristic of this strain for sheep.

REFERÊNCIAS

1. HOMSE, A.C.; CASARO. A.P.; CAMPERO, C.M. Infertilidad em ovelhas por *B. ovis*. *Vet. Argent.*, v.12, n.114, p.243-249, 1995.
2. BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, n.2, p.313-5, 1990.
3. HODGEN, G., EVANS, D. Ovine brucellosis. Austrália: FARMNOTE, 1996. Disponível em: <http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/1996/f01096.htm>. Acesso em: 14. ago. 2006.

4. TAMAYO, R.; VALENTIN, H.; SCHOEBITZ, R. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. *Arch. Méd. Vet.*, v.21, n.1, p.22-28, 1989.
5. PLANT, J.W.; EAMENS, G.J.; SEAMAN, J.T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.
6. WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; 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.
7. 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.
8. NAREZ, G.M. ; APARICIO, E.D.; ÁLVAREZ, J.F.M. et al. Epididimitis ovina : estudios bacteriológico y serológico. *Vet. Méx.*, v.30, n.4, p.329-336, 1999.
9. MANAZZA, J. Brucelosis ovina. Buenos Aires: INTA, 2005. Disponible em: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/gsa.htm>. Acceso em: 15 jun. 2007.
10. BASSI, S.D. ; CERRI, D. ; BROUSSARD, A. et al. Epididimite del montone da *Brucella ovis* in Lombardia : Rilievi sierologici e batteriologici. *Selez. Vet.* v.11, p.845-855, 1988.
11. GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M. et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Record*, v.144, p.555-558, 1999.
12. RAMOS, A. A. et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. *Pesqui. Agropec. Bras.*, v.1 p.211-213, 1966.
13. BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990c. p.351-378.
14. BLASCO, M.J.M. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. En: BLASCO, M.J.M., MORIYÓN, U.I., editores. Brucelose ovina. Tratado de patología y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, p.25-32, 1990a.
15. BLASCO, M.J.M. La epididimitis contagiosa del morrueco. En: BLASCO, M.J.M., MORIYÓN, U.I., editores. Brucelosis ovina. Tratado de patología y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, p.89-96, 1990b.
16. ALTON, G.G., JONES, L.M.; ANGUS, R.D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988, 109p.
17. BLASCO, J. M.; BARBERÁN, M. *Brucella ovis*: epidemiología, patogenia y cuadro clínico. *Ovis*, v.8, p.25-32, 1990.
18. HUGHES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.*, v.44, p.41-47, 1968.
19. MARCO, J.; GONZÁLEZ, L.; CUERVO, L.A. et al. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet. Rec.*, v.135, p. 254-256, 1994.
20. BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.
21. 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.
22. BIBERSTEIN E.L. et al. Epididymitis in rams studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, p.27-41, 1963.
23. GAMAZO, C.; WINTER, A.J.; MORIYON, I.; RIEZU-BOJ, J.I.; BLASCO, J.M. et al. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infec.Immu.*, v.57, n.5, p. 1419-1426, 1989.

24. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIE - OIE. *Manual of Standards diagnostic tests and vaccines*. 2000. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00062.htm>. Acesso em: 20. ago. 2007.
25. CORBEL, M.J.; BRINLEY-MORGAN, W.J. Genus *Brucella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1984, p.377-388.
26. MOLLELO, J.A.; JENSEN, R.; FLINT, J.C.; COLLIER, J.R. Placental pathology. I. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.102, p.897-904, 1963.
27. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
28. 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.
29. ALTON, G.G. *Brucella canis*. In:_____. *Las técnicas de laboratorio en la brucellosis*. Genebra: OMS, 1976, p. 161-165.
30. 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. 172-5, april 1980.
31. LAWS, L.; SIMMONS, G.C.; LUDFORD, C.G. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.313-317, 1972.
32. 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.
33. QUISPE, R. Ch.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.13, n.1, p.61-66, 2002.

Adaptação e avaliação da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase frente ao cultivo microbiano em diferentes materiais de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo adaptar e avaliar a PCR comparativamente ao cultivo microbiano para a detecção de *B. ovis* em sêmen, urina e órgãos de ovinos inoculados experimentalmente. Foram utilizados 31 carneiros com 1-2 anos de idade, desafiados via intraprepucial e conjuntival com uma suspensão contendo 2×10^9 UFC de *B. ovis*. Todos os animais inoculados foram submetidos, semanalmente, à colheita de sêmen e urina para cultivo e realização da PCR. Dos 31 animais inoculados experimentalmente a PCR detectou o DNA da bactéria em 51 amostras de sêmen enquanto pelo cultivo obteve-se isolamento do agente em 19 amostras. A PCR apresentou sensibilidade superior (21,6%) ao cultivo (8,0%). Para as amostras de urina a sensibilidade das técnicas foi similar (10,1% para cultivo e 12,7% para PCR). A PCR apresentou uma positividade superior quando comparada ao cultivo microbiano, detectando a presença do agente em 21,5% das amostras de órgãos testados, enquanto no cultivo microbiano observou-se crescimento da bactéria em apenas 3,3% das amostras. A utilização associada das duas técnicas é recomendada, uma vez que permite um diagnóstico mais eficiente.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, PCR, cultivo microbiano, órgãos, carneiros

ABSTRACT

The objective of the study was to adapt and evaluate PCR compared with microbiological culture in the detection of *B. ovis* in semen, urine and organs of experimentally inoculated rams. Thirty one rams, 1-2 years old, were challenged by intrapreputial and conjuntival route with a suspension containing 2×10^9 CFU/mL of *B. ovis*. All animals inoculated were weekly submitted to clinical evaluation, as well as collection of blood for serological diagnosis, and collection of semen and urine for culture and PCR. From the 31 experimentally inoculated animals, PCR detected bacterial DNA in the 51 semen samples,

whereas culture showed the agent in 19 samples. PCR showed greater sensitivity (21,6%) than culture (8,0%). In urine samples, sensitivity of the techniques was similar (10,1% for culture and 12,7% for PCR). PCR detected the presence of the agent in 21,5% of the samples organs tested while culture detected it in only 3,3% of the samples. The semen or urine PCR associated to microbiological culture is recommended for an efficient diagnosis.

Key words: *Brucella ovis*, PCR, culture, rams, epididymitis

INTRODUÇÃO

Brucella ovis é a causa de uma enfermidade clínica ou subclínica de ovinos, caracterizada por epididimite e subsequente diminuição da fertilidade em carneiros, podendo causar também atrofia testicular¹. Em ovelhas pode causar abortos ocasionais^{2, 3} e nascimento de cordeiros prematuros ou fracos⁴. A frequência das lesões e o número de carneiros infectados que não apresentam lesões, aumentam com a idade e quantidade de épocas de serviço, uma vez que é uma enfermidade de transmissão principalmente sexual³.

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado com a combinação de exame clínico, isolamento da bactéria em amostras de sêmen, órgãos, descargas vaginais e leite de animais infectados^{3, 5,6} e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo⁷. O exame clínico de carneiros visando determinar a presença de alterações testiculares tem valor limitado para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* devido à existência de carneiros infectados sem sinais clínicos e pelo desenvolvimento de epididimite por outras espécies de bactéria⁸⁻¹⁴.

Métodos bacteriológicos, não permitem detectar todos os animais infectados, animais na fase aguda ou crônica, podem eliminar o agente de forma intermitente⁵ ou mesmo, não eliminá-lo¹⁵. Por isso, recomenda-se a realização de amostras seriadas para o cultivo bacteriano, visando aumentar a possibilidade de êxito⁸. Além disso, o método é demorado, uma vez que as colônias se tornam visíveis apenas a partir de 3-5 dias de incubação e,

algumas vezes, é necessário a repetição do processo devido a presença de contaminantes que podem inibir o crescimento da bactéria⁷.

Os métodos sorológicos são os mais utilizados, porém, não existe um método que aplicado isoladamente seja capaz de detectar todos os animais positivos¹⁶. Além disso, animais com sorologia negativa podem eliminar a bactéria no sêmen¹⁷⁻¹⁸, sendo responsáveis por resultados falso-negativos em métodos sorológicos^{17, 19-21}.

Atualmente técnicas mais específicas como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) são utilizadas para detecção de *Brucella* spp²²⁻²⁸ em diferentes materiais por apresentar-se como um método rápido, altamente sensível e específico na detecção da bactéria²⁹.

A PCR foi utilizada no diagnóstico da brucelose canina em amostras de sêmen e *swab* vaginal, empregando os *primers* B4 e B5, demonstrando que a técnica poderia ser adotada para confirmar resultados no diagnóstico de imunodifusão com uso do 2-mercaptoetanol³⁰. Em 2004, outros pesquisadores, utilizando os *primers* ITS66 e ITS279, no diagnóstico da brucelose canina, observaram que estes eram altamente específicos para *Brucella* e apresentavam elevada sensibilidade analítica. A PCR com estes *primers* detectou maior quantidade de animais quando comparado ao isolamento bacteriano³¹.

Acreditava-se na impossibilidade do uso da técnica de PCR na detecção de DNA de *Brucella* em sêmen de ovinos e bovinos devido a presença de substâncias no sêmen que impediam a amplificação da reação, sendo considerado que a obtenção do DNA de *Brucella* só era possível quando se separava o fluido seminal da fração celular³². Entretanto este fato não foi verificado quando se utilizaram os primers direcionados para a região interespaçadora 16S-23S rRNA em amostras de sêmen, não fracionadas, de cães naturalmente infectados por *Brucella canis*³³.

A utilização da PCR em amostras de sêmen para detecção de *Brucella*, tem sido descritas por vários autores^{26,27,30,32}.

Entretanto, atualmente, não existe uma PCR que seja específica para *B. ovis*, o que representa um grande problema em áreas onde *B. melitensis* não seja endêmica. Um elemento de inserção da sequência de *B. ovis*, denominado IS6501, apresentou 836pb da sequência de nucleotídeo e ocorreu 20-35 vezes

no genoma de *B. ovis* e 5-15 vezes em outras espécies de *Brucella* (Ouahrani et al., 1993). A sensibilidade da PCR, com utilização de kits de extração, foi comparada ao cultivo microbiológico em amostras de sêmen de carneiros para a detecção de *B. ovis*. A técnica de PCR demonstrou sensibilidade de 51,9% comparativamente ao cultivo que foi de 50%. Os autores relataram que a baixa sensibilidade da técnica de PCR seria devido a eliminação intermitente de *B. ovis* no sêmen, o que também explicaria o fato de alguns animais soropositivos resultarem negativos à cultura de sêmen. Porém, quando avaliados swabs de sêmen de controles negativos constituídos por carneiros livres de *Brucella* spp., as amostras apresentaram-se sempre negativas, indicando a alta especificidade da técnica²⁶. Sensibilidade similar para PCR e cultivo, também foi observada ao se utilizar um multiplex PCR para a detecção de *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis* em sêmen de carneiros²⁷.

Com isso, considerando a alta especificidade da reação de PCR associada à rapidez para obtenção de diagnóstico e o custo de utilização dos kits de extração comercial, pretendeu-se adaptar e avaliar a reação de PCR para *B. ovis* em amostras de sêmen, urina e órgãos de animais inoculados experimentalmente comparativamente ao cultivo microbiano, considerando a sua aplicabilidade na rotina diagnóstica.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu, no período de 2004-2007.

Inóculo: Utilizou-se a cepa *B. ovis* **REO 198**, liofilizada, obtida do Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”. FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS.

Animais: Foram utilizados 31 carneiros com um a dois anos de idade, desafiados com 2mL via intraprepucial e 50µL via conjuntival de suspensão bacteriana contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis*, simultaneamente². Todos os animais inoculados foram previamente submetidos, à colheita de sangue para análise sorológica frente a *B. ovis* e de sêmen e urina para cultivo e PCR,

resultando negativos em todos os métodos diagnósticos. Posteriormente à inoculação, foram realizadas colheitas semanais de sêmen e urina para cultivo bacteriano e reação de PCR. Visando a detecção do agente nos órgãos, foram eutanasiados um animal aos 15 dias pós-inoculação, dois animais a cada 15 dias até os quatro meses, seguidos por eutanásia de dois animais por mês, até os oito meses pós-inoculação.

Colheita de sêmen: O sêmen de cada animal foi obtido por eletroejaculação³⁴.

Colheita de urina: Urina foi colhida, semanalmente, para posterior cultivo microbiológico e realização de PCR, por meio de bloqueio da respiração do animal por 30 segundos a um minuto, após o que o animal urinava espontaneamente.

Colheita dos órgãos: Dos animais sacrificados foram colhidos e macerados no mesmo dia, os linfonodos (parotídeo, pré-escapular, faríngeo, mediastínico, mesentérico, inguinal), glândulas parótidas e mandibulares, pulmão, fígado, baço, rim, bexiga, epidídimo, testículo, vesícula seminal, glândula bulbo-uretral e ampola, para realização da PCR e cultivo bacteriano. Fragmento do órgão colhido foi macerado, com êmbolos de vidro, em placa de petri descartável, estéril com 1mL de solução fisiológica estéril. Uma parte da solução do macerado era utilizada para o cultivo bacteriano e o restante aliquoteado em eppendorfs e mantidos a -20°C para realização da PCR.

Cultivo e Isolamento de *B. ovis*: Sêmen, urina e macerado de órgãos de todos os animais foram semeados em placas com meio de Thayer-Martin modificado e ágar Brucella Sangue³⁵. As placas foram incubadas em atmosfera de 10% de CO₂, por aproximadamente, 3-7 dias, em estufa a 37°C. As colônias suspeitas foram identificadas por coloração de Ziehl-Neelsen e Gram, testes de urease e catalase positiva, oxidase negativa, ausência de produção de H₂S e redução de nitrato para nitrito e crescimento na presença de tionina e fucsina básica³⁶.

PCR para amostras de sêmen, urina e órgãos: Para PCR, foi realizado pool das amostras semanais de sêmen e urina de cada animal, sendo consideradas para realização da técnica, uma amostra mensal de cada animal. Foi realizado também um pool de cada órgão de cada dupla de animal sacrificado em cada etapa.

Foram utilizados no preparo das amostras e extração, protocolos utilizados por diferentes autores^{26, 28, 30, 36} e direcionados à detecção de diferentes espécies de *Brucella* em sêmen e tecidos de outras espécies animais. Em ovinos somente os *primers* e ciclos para amplificação, já haviam sido publicados e avaliados na detecção de *B. ovis* em ovinos.

A sensibilidade da PCR para as amostras de sêmen, urina e órgãos foi realizada preparando-se uma suspensão concentrada de *B. ovis*, segundo a escala de MacFarland a 10^{-1} , estimando que a suspensão apresentasse uma concentração de 3×10^6 UFC/mL³⁷. Foram realizadas a partir da suspensão inicial, diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} , sendo 100µL distribuídas em placas contendo o meio Thayer Martin modificado e incubadas por 3-5 dias para crescimento das colônias, que posteriormente foram contadas para confirmação do número de UFC/mL. Adicionalmente a concentração do DNA bacteriano, em cada suspensão, foi avaliada por espectrofotômetro em DO 260nm, sendo, a partir de então, utilizado 1µL de cada suspensão para contaminação de amostras sabidamente negativas abaixo relacionadas.

A concentração de DNA das amostras de sêmen, urina e órgãos (bexiga, pulmão, baço, fígado, ampola, glândula bulbouretral, próstata, linfonodos, epidídimo e testículo) de animais sabidamente negativos, foram avaliadas por espectrofotômetro por medida da densidade ótica de 260nm (uma absorbância 1U correspondente a 50µg de DNA genômico por mL).

Foram contaminadas as amostras de sêmen, urina e órgãos, visando avaliar o limiar de detecção. Para isto, utilizou-se 1µg de DNA genômico de cada amostra adicionado a 1µL de cada diluição bacteriana. As amostras assim contaminadas foram submetidas ao protocolo de amplificação citado a seguir. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

Extração do DNA para amostras de sêmen: Amostras de sêmen (aproximadamente 500 μ L) foram descongeladas e adicionadas a 500 μ L tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0), as amostras foram incubadas a 80°C por 10min. Posterior centrifugação foi realizada a 13,000 x g por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e foram realizadas lavagens repetidas por 2-3 vezes, até que o sobrenadante ficasse límpido. Para amostras de sêmen muito cremosas realizava-se até quatro lavagens. O restante do processo de extração foi realizado segundo protocolo já publicado³³.

Após as lavagens, o precipitado foi ressuspensionado com 500 μ L tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 constituído por 10mM Tris-HCl pH 8,0, 25mM EDTA pH 8,0, 100mM NaCl, 50 μ L SDS 10% e 10 μ L proteinase K (20mg/mL). Incubação posterior foi realizada a 37°C por 24h. A fase aquosa contendo o ácido nucléico foi extraída utilizando o método de fenol/clorofórmio/álcool isoamil^{28, 30,38}. O pellet final foi ressuspensionado com 30 μ L de TE pH 8,0 e incubados a 56°C por 30 min. O material foi estocado a -20°C até o momento da reação.

Extração do DNA para amostras de urina: Amostras de urina (aproximadamente 500 μ L) foram descongeladas e adicionadas em 500 μ L tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e centrifugadas a 13,000 x g por 15min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado conforme protocolo citado para extração de sêmen.

Os passos seguintes seguiram o citado anteriormente.

O pellet final foi ressuspensionado com 30 μ L de TE pH 8,0 e incubados a 56°C por 30 min. O material foi estocado a -20°C até o momento da reação.

Extração do DNA para amostras de órgãos: Amostras de macerados de órgãos (aproximadamente 200 μ L) foram descongelados e adicionados em 800 μ L tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0), respectivamente e centrifugadas a 13,000 x g por 15min. O sobrenadante foi desprezado e as lavagens repetidas por 3-4 vezes até que o sobrenadante ficasse límpido.

Após as lavagens, o precipitado foi ressuspenso com 350µL da solução (10mM Tris-HCl pH 8,0, 25mM EDTA pH 8,0, 100mM NaCl), com incubação a 80°C por 10min. e acréscimo posterior de 50µL da solução (1% SDS e 12µL proteinase K 20mg/mL). A incubação foi realizada a 37°C por 24h. A fase aquosa contendo o ácido nucléico foi extraída utilizando o método de fenol/clorofórmio/álcool isoamil^{28, 30,38}.

O pellet final foi ressuspenso com 60µL de TE pH 8,0 e incubados a 56°C por 30 min. O material foi estocado a -20°C até o momento da reação.

Amplificação: O processo de amplificação foi o mesmo para as amostras de sêmen, urina e macerado de órgãos. Os *primers* utilizados foram o ISP1 e ISP2, designados para a seqüência de nucleotídeo da *Brucella* IS 6501 (ISP1 F: 5'- GGTTGTTAAAGGAGAACAGC - 3' e ISP2 R: 5'- GACGATAGCGTTTCAACTTG - 3')²⁶.

O mix para reação de PCR foi realizado com base em Keid et al.³³, constituindo um volume final de 25µL, por tampão de reação 1X, 200µM de cada dNTP, 2,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 1 mM MgCl₂, 5U/µL *Taq* platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5µL do DNA extraído. O processo de amplificação foi realizado segundo protocolo já relatado²⁶. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

A análise do produto amplificado foi realizada utilizando-se a técnica da eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8.0). As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular sendo consideradas positivas aquelas com peso molecular aproximado de 700 bp.

Extração do DNA de *B. ovis* para controle positivo: Para extração do DNA da bactéria, utilizou-se cultura pura de *B. ovis*. Com ajuda de uma alça descartável estéril, colheu-se uma porção da colônia e adicionou-se em 400µL tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0. A extração seguiu o mesmo protocolo utilizado para as amostras de sêmen e urina, sendo que o produto final foi ressuspenso com 100µL de TE pH 8,0. Após extração estocou-se a -20°C até o momento da reação.

Análise estatística: Para análise dos resultados, as amostras foram classificadas em positivas e negativas nos testes de PCR e cultivo bacteriano, considerando-se com isso, as freqüências de ocorrência dos resultados para a PCR e cultivo bacteriano nas amostras mensais, sendo avaliado o percentual de associação entre os resultados das provas, utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon³⁹.

RESULTADOS

A concentração de DNA extraído da suspensão bacteriana na escala 10^{-1} de MacFarland, foi de $0,23\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA bacteriano e a concentração do DNA genômico das amostras de sêmen $1,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$, urina $0,8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e dos órgãos sabidamente negativos apresentaram concentração de $0,76\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para bexiga, $0,37\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para pulmão, $1,70\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para baço, $1,15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para fígado, $0,20\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para ampola, $0,15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para glândula bulbouretral, $4,6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para pool de linfonodos, $0,36\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para epidídimo e $2,13\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para testículo. Em nenhum momento, foram observadas reações positivas para as amostras utilizadas como controle negativo.

A PCR com os primers ISP1 e ISP2 amplificou DNA nas amostras de sêmen, urina e órgãos com diluições até 10^{-4} , com exceção das amostras de linfonodos e baço que resultaram positivas somente até as diluições de 10^{-3} .

Em relação as 236 amostras de sêmen testadas, a PCR apresentou melhor sensibilidade que o cultivo, detectando 51 amostras positivas enquanto o cultivo detectou 19 amostras. Para as amostras de urina a sensibilidade das técnicas foi similar. A PCR dos órgãos demonstrou sensibilidade superior ao cultivo bacteriano. A análise estatística demonstrou que os testes são independentes e não houve concordância entre as provas quando comparados o cultivo bacteriano com a PCR (Tab.1).

Tab.1. Resultado do isolamento e PCR para *B. ovis* em carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, segundo o material clínico investigado. Botucatu-SP, 2004-2007.

	SÊMEN (%) ¹	URINA (%)	ÓRGÃOS (%)
ISOLAMENTO	19/236 (8,0)	24/236 (10,1)	7/209 (3,3)
PCR	51/236 (21,6)	30/236 (12,7)	45/209 (21,5)

¹Proporção: número de positivos/número de amostras

A frequência de amostras positivas para o cultivo bacteriano de sêmen e urina com a PCR dos animais inoculados experimentalmente, está demonstrado nas FIGURAS 2 e 3.

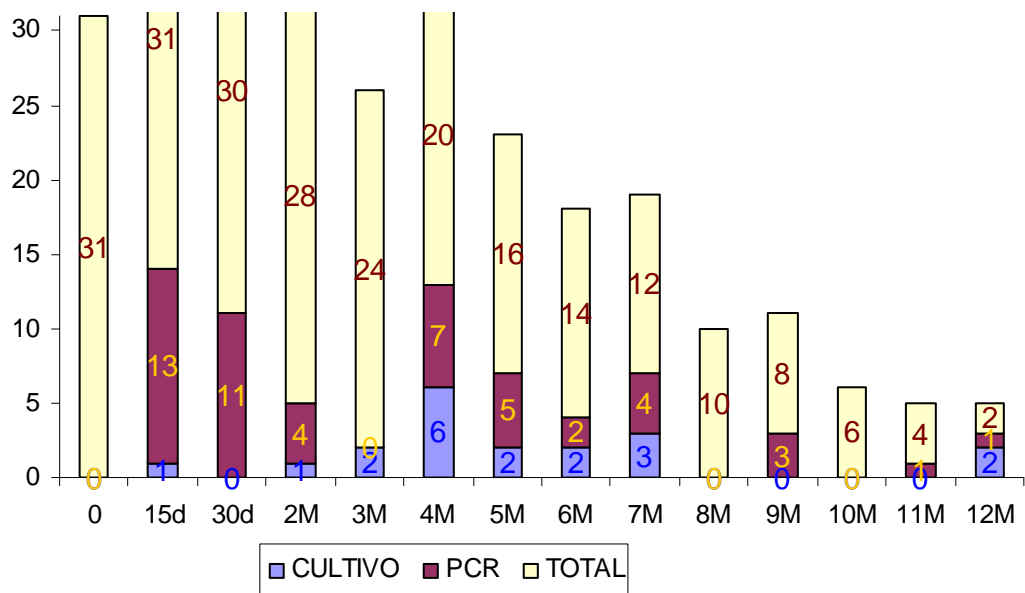


FIGURA 2. Frequência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em amostras de sêmen de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198. Botucatu-SP.

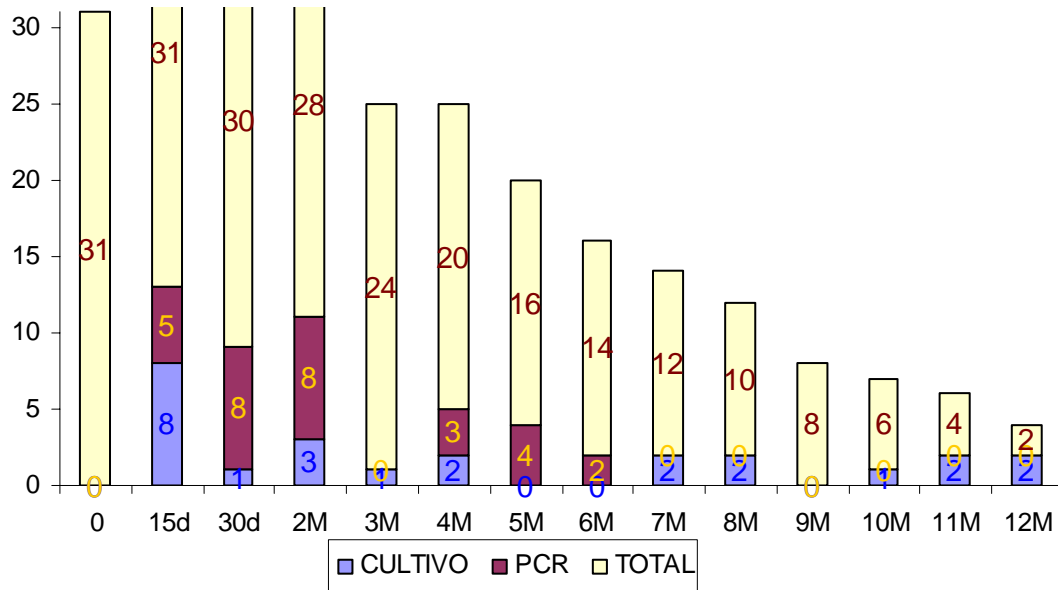


FIGURA 3. Frequência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em amostras de urina de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198. Botucatu-SP.

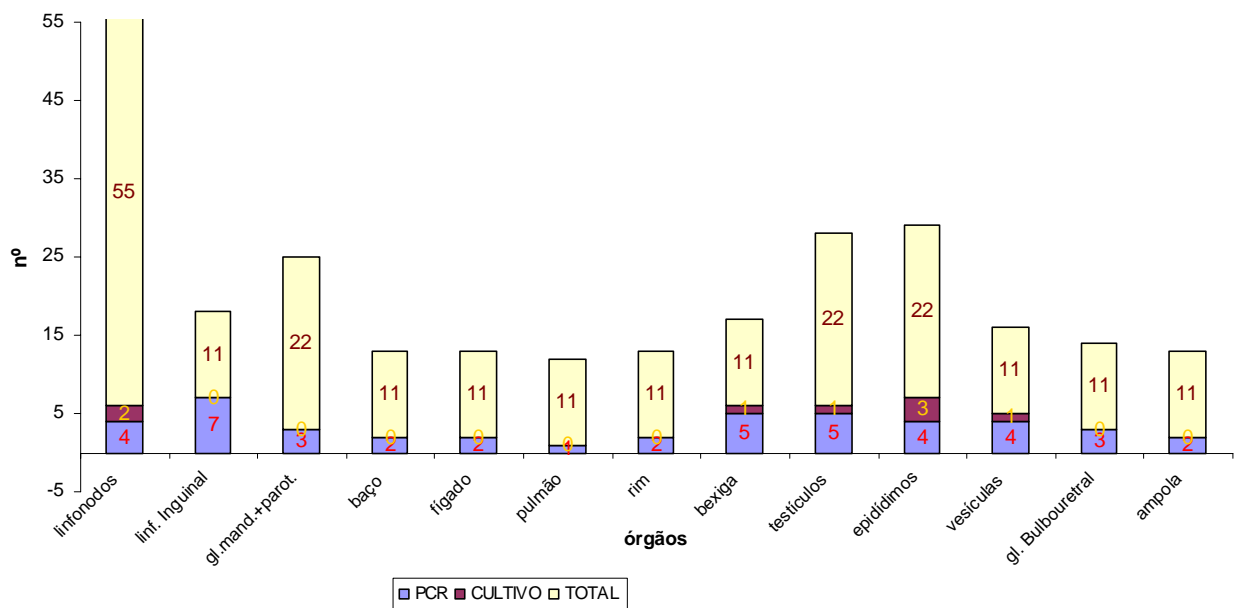


FIGURA 4. Frequência de positividade para o cultivo bacteriano e PCR em diferentes órgãos de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, número de amostras totais. Botucatu-SP.

A tabela 2 representa a porcentagem de concordância, entre as provas de PCR e cultivo microbiano, sendo o 1º quartil representado por 25% das amostras e o 3º quartil, por 75% das amostras. Para o sêmen, a mediana ou 50% das amostras testadas, apresentaram percentual de 72,7% de concordância entre PCR e cultivo, quando analisadas mensalmente. Para

urina, 50% das amostras testadas apresentaram percentual de 75% de concordância quando avaliadas aos testes de PCR e cultivo microbiano. Porém para ambas as amostras, sêmen ou urina, não houve diferença estatística significativa quando avaliados o percentual de concordância entre os testes.

Tabela 2. Medidas descritivas da porcentagem de concordância entre os testes de PCR e cultivo bacteriano, segundo tipo de amostras.

Medida descritiva	Tipo de amostra		Resultado teste estatístico (p valor)
	Sêmen (%)	Urina (%)	
Valor mínimo	33,3	33,3	
1º Quartil	61,5	62,5	
Mediana	72,7	75	
3º Quartil	83,7	100	P>0,05
Valor máximo	100	100	
Média±desvio padrão	73 ± 17,9	76,1 ± 21	

DISCUSSÃO

A reação de PCR nas amostras de sêmen não apresentou dificuldades no processo de extração, discordando do relatado por alguns autores que afirmam que a amplificação de DNA de *Brucella* em sêmen ovino e bovino só era possível quando se separava a fração celular do fluido seminal, sendo este último utilizado no processo de extração do DNA³².

O limiar de detecção encontrado para as amostras de linfonodos e baço, no presente estudo, resultaram positivas somente até as diluições de 10^{-3} , demonstrando concordância com autores que afirmam que a presença de inibidores (como a hemoglobina) pode influenciar a reação^{40,41}.

Trabalhos avaliando o limiar de detecção da PCR para *B. ovis* em órgãos, sêmen e urina de ovinos, não foram encontrados na literatura consultada, com exceção do relatado por Saunders et al., na qual utilizando um multiplex PCR para detecção de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* em sêmen de carneiros, observaram sensibilidade de 25 UFC²⁷.

A sensibilidade analítica encontrada para os demais órgãos e amostras de sêmen e urina foi de 3×10^2 UFC/mL, concordantes com Amim et al.³², que relataram sensibilidade analítica de 10^2 UFC/mL utilizando *primers* específicos de *B. melitensis* para detecção de brucelose em sêmen ovino e bovino.

Resultados discordantes foram observados por Kim et al.⁴², que empregando uma PCR contra o gene *vriB2* de *Brucella* spp. para detecção de DNA de *Brucella* em amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com *B. canis*, relataram sensibilidade de 10³UFC/mL. Sensibilidade de 1.0 x 10⁰UFC/mL foi observado em pool de amostras de sêmen de cães naturalmente infectados com *B. canis*⁴³.

Na detecção de *B. ovis* do presente estudo, as amostras de sêmen apresentaram 8,0% de positividade pelo isolamento e 21,6% pela PCR, enquanto para as amostras de urina, as positivities foram 10,1% para isolamento e 12,7% para PCR. Estes resultados foram discordantes do relatado por outros autores⁴⁴ que obtiveram percentual superior para o isolamento de *B. ovis* em 56% do sêmen dos 16 animais inoculados. Esse baixo percentual de carneiros positivos bacteriologicamente, concordam com o achado de outros pesquisadores, que relatam que esse percentual é sempre menor que o de carneiros afetados clinicamente ou sorologicamente positivos⁴⁵. Percentual de 50% (26 animais) de isolamento positivo para *B. ovis* em animais com sorologia positiva já havia sido descrito, sendo que os autores justificaram esse baixo percentual de isolamento devido à baixa sensibilidade do meio de Thayer Martin modificado para cultura de sêmen²⁶. Afirmação de que este meio poderia apresentar a desvantagem de ser inibidor para algumas cepas de *B. ovis*, que podem não se desenvolver ou apresentar um crescimento mais lento, já havia sido relatada, recomendando-se prolongar o tempo de incubação⁴⁶.

Quando se comparam os resultados do cultivo bacteriano dos órgãos dos animais infectados obtidos neste estudo com o já publicado⁴⁷, observa-se que os resultados são muito discrepantes, uma vez que se detectou um baixo percentual de isolamentos positivos. Essa diferença pode ser explicada pelo tipo de meio de cultura utilizado no experimento, que embora seja considerado como meio seletivo, permitiu o crescimento de contaminantes nas placas, o que poderia estar inibindo a identificação da colônia bacteriana. O maior percentual de isolamento foi observado nos órgãos genitais (testículos, vesícula seminal, epidídimos, glândula bulbo uretral), reafirmando a predileção da bactéria pelo trato reprodutivo⁴⁸⁻⁵⁰.

O teste de PCR nas amostras de sêmen demonstrou sensibilidade superior quando comparado com o cultivo bacteriano. Embora o gráfico apresente algumas amostras com frequências negativas, isto pode ser explicado pela eliminação intermitente da bactéria no sêmen⁵. O cultivo das amostras de urina demonstrou frequência de positividade, ausentes em algumas amostras quando detectadas pela PCR, fato que pode ser explicado talvez pelo excesso de DNA nas amostras testadas que poderiam ser potenciais inibidores da PCR⁵¹.

A sensibilidade do teste de PCR nas amostras de sêmen (21,6%) foi superior quando comparada com o isolamento da bactéria (8,0%), concordando com o relatado por vários autores^{24, 52}, que referem maior sensibilidade da técnica comparativamente ao isolamento. Resultados discordantes foram observados por diversos autores, os quais utilizando os mesmos pares de *primers*, obtiveram sensibilidade para a PCR de 51,9%²⁶ e outros que observaram sensibilidade semelhante para PCR e cultivo (3/3), quando utilizaram um multiplex PCR para detecção de *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* em sêmen de carneiros²⁷.

Para urina a sensibilidade da PCR (12,7%) foi quase semelhante ao isolamento (10,1%), enquanto para os órgãos dos animais eutanasiados a sensibilidade da PCR apresentou um percentual de 21,5%. Os resultados encontrados no presente estudo foram concordantes aos observados por outros pesquisadores, na qual avaliaram amostras de conteúdo gástrico e/ou órgãos de bovinos na detecção de *Brucella abortus* e obtiveram resultados negativos para o cultivo microbiológico e positivo para PCR²⁸, porém foram discordantes do relatado por O'Leary et al., que observaram não haver diferença entre PCR e cultivo microbiológico ao analisarem linfonodos de vacas sorologicamente positivas para *B. abortus*²³.

Neste estudo, observou-se que a técnica de PCR detectou maior número de amostras positivas em relação ao cultivo bacteriano, demonstrando que a técnica assim adaptada poderia constituir uma alternativa no diagnóstico para confirmação de infecção por permitir um diagnóstico rápido, uma vez que o isolamento caracteriza-se por ser um método que consome muito tempo e por isso pouco prático como teste de rotina em animais assintomáticos. Porém, quando analisados a porcentagem de concordância entre as técnicas, verificou-

se não haver diferença estatística significativa entre as provas. Com isso, a utilização associada entre as duas técnicas é recomendada, uma vez que proporciona um diagnóstico mais eficiente para enfermidade.

REFERÊNCIAS

1. NUNEZ-TORRES, E.; DÍAZ-APARICIO, E.; TENORIO, V.R. et al. Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, Columbia, v.10, n.1, p.113-115, 1998.
2. BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.351-378.
3. BAIGUN, R.; CONIGLIARO, A.S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serologicos en epididimitis ovina. *Vet. Argent.*, v.17, n.162, p.102-107, 2000.
4. EISTEN, S. M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epidemitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.*, v.31, n.1, 1999.
5. 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. 172-5, abril 1980.
6. 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.
7. ALTON, G.G., JONES; L.M.; ANGUS, R.D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 109p.
8. BLASCO, J. M.; BARBERÁN, M. *Brucella ovis*: epidemiologia, patogenia y cuadro clínico. *Ovis*, v.8, p.25-32, 1990.
9. RUELAS, D.C., ROSADIO, R.A. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis ovina. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.10, n.2, p.43-55, 1999.
10. JANSEN, B.C. The aetiology of ram epididymitis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.47, p.101-107, 1980.
11. VAN TONDER, E.M. Examination of rams for genital soundness. *J. South African Vet. Med. Assoc.*, v.48, p.267-272, 1977.
12. LOZANO, E.A. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.1153-1156, 1986.
13. MYERS, D.M. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Appl. Microbiol.*, v.26, p.855-857, 1973.
14. KOTT, R.W.; HALVER, G.C.; FIREHAMMMER, B. et al. Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology*, v.29, n.4, p.961-970, 1988.
15. NOGUEIRA, A.H.C.; FERRARI, C.I.L. ; CURCI, V.C.L.M. Brucelose ovina (*Brucella ovis*). São Paulo: APTA REGIONAL, 2006. Disponível em: http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/apta_brucelose_ovina.htm. Acesso em: 20 jul. 2007.
16. ROBLES, C. A. Evaluacion de una tecnica de doble difusion em gel de agar para el diagnostico de la infeccion por *Brucella ovis* em carneros. *Vet. Argent.*, v.15, n.142, p.119-124, 1998.

17. BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, n.2, p.313-5, 1990.
18. MARCO, J. .; GONZÁLEZ, L.; CUERVO, L.A. et al. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet. Rec.*, v.135, p. 254-256, 1994.
19. HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double gel diffusion test and enzyme-linked immunosorbente assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.*, v.41, p.111-115, 1993.
20. PLANT, J.W.; EAMENS, G.J.; SEAMAN, J.T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.
21. 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.
22. KEID, L.B. The polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Brucella* spp. in whole-blood of naturally infected dogs. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, supl. p.1-749, 2004.
23. 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, n.2, p.170-176, 2006.
24. HAMDY, M.E., AMIM, A.S. Detección de *Brucella* Species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet. J.*, v.163, p.299-305, 2002.
25. ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.5, p.3735-3737, 1999.
26. MANTEROLA, L., TEJERO-GARCÉS, A., FICAPAL, A. et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.*, v.92, p.65-72, 2003.
27. 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, n1-2, p.72-77, 2007.
28. CORTEZ, A., SCARCELLI, E., SOARES, R. M. et al. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetus by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* v. 79, n. 7, p. 500-1, 2001.
29. BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.2402, p.1-12, 2002.
30. KEID, L. B. *Diagnóstico da Brucelose canina por Brucella canis. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2 mercaptoetanol, cultivo e PCR.* São Paulo, 2001. 96p. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
31. VIEIRA, N.R. Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
32. AMIM, A.S., HAMDY, M.E., IBRAHIM, A.K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.*, v.83, p.37-44, 2001.

33. KEID, L.B. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet. Res. Commun.*, v.31, p.951-965, 2007.
34. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
35. 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.
36. ALTON, G. G. *Brucella canis*. In:_____. *Las técnicas de laboratorio en la brucellosis*. Ginebra: OMS, p. 161-5., 1976.
37. BIER, O. *Microbiología e Inmunología*. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234p.
38. 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.271-75, 1992.
39. NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. *Biostatistics: the base essentials*. St. Louis: Mosby Year Book, 1994. 260p.
40. MORATA, P., QUEIPO-ORTUÑO, M.I., COLMENERO, J.D. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.9, p.2443-2446, 1998.
41. QUEIPO-ORTUÑO, M.I., GARCIA-ORDONEZ, M.A., COLMENERO, J.D. et al. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*, v.27, p.248-252, 1999.
42. 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.
43. KEID, L.B., SOARES, R.M., VASCONCELLOS, S.A. et al. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*, v.67, n.7, p.1203-1210, 2007.
44. GARCÍA-CARRILLO, C., CUBA-CAPARÓ, A., MYERS, D.M. Susceptibilidad comparada de cabritos y carneros a la infección causada por *Brucella ovis*: estudios serológicos, bacteriológicos y patológicos. *Gazeta Vet.*, v.36, p.355-374, 1974.
45. 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.
46. PAOLICCHI, F.; TERZOLO, H.; MALENA, R. et al. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. *Rev. Argent. Microbiol.*, v.23, p.155-159, 1991.
47. BIBERSTEIN E.L., MCGOWAN, O., KENNEDY, P.C. Epididymitis in rams studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, p.27-41, 1963.
48. 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.
49. WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; 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.
50. 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.

51. SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, New York, p.252, 1977.
52. FEKETE, A.; BANTLE, J.A. ; HALLING, S.M. et al. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacter.*, v.69, p.216-227, 1990.

Perfil sorológico de carneiros inoculados experimentalmente com *Brucella ovis* em diferentes fases da doença: I-associação com sinais clínicos; II-avaliação do teste de imunodifusão em ágar gel e teste de soroaglutinação rápida.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar o perfil sorológico de ovinos após inoculação experimental com *B. ovis*, utilizando Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e Soroaglutinação rápida (SAR) e associá-lo aos sinais clínicos. Foram utilizados 31 carneiros com 1-2 anos de idade, submetidos, simultaneamente, à inoculação via conjuntival e via intraprepucial de uma solução contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis* REO 198. Após a inoculação, os animais foram submetidos, semanalmente, à colheita de sangue, para diagnóstico sorológico e avaliação clínica. Na SAR o percentual de positivos decresceu de 80% a 11% da segunda à sétima semana após a inoculação. Na IDGA o percentual aumentou de 45% a 63%, da primeira a terceira semana e depois decaiu para 4% na 11ª semana. Flutuações de títulos foram observadas nos animais em ambas as provas avaliadas. Alterações clínicas se iniciaram a partir da 1ª semana pós-inoculação estando associada à sorologia positiva na fase aguda da enfermidade. A IDGA apresentou sensibilidade variável ao longo dos períodos, detectando animais positivos na fase crônica da doença, sendo a mais favorável no uso como diagnóstico de rotina. O uso associado da IDGA e exame clínico são indicados no diagnóstico da enfermidade e o achado de animais positivos em um ou outro método poderia ser considerado indicativo de infecção por *B. ovis*.

Palavras-chave: Imunodifusão em gel de ágar, Soroaglutinação rápida, brucelose, ovinos, sinais clínicos, inoculação experimental, sorologia

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the serological profile of rams experimentally inoculated with *B. ovis* using immunodiffusion in agar gel and rapid serum agglutination test and associate these results with clinical signs. Thirty one rams, 1-2 years old, were submitted to conjunctival and intrapreputial simultaneous inoculation with a solution containing 2×10^9 CFU/mL

B. ovis REO. After inoculation, animals were submitted to clinical evaluation and collection of blood for serology every week. SAR showed a decreasing percentage of positive results, from 80% to 11%, from the second to the seventh week after inoculation. IDGA showed increasing percentages of positive results, from 45% to 63%, from the first to the third week, and then a decrease to 4% in the 11th week. Fluctuation in titers was observed in both tests. Clinical changes began in the first week after inoculation and were associated with positive serology in the acute phase of the disease. IDGA demonstrated variable sensitivity in the different phases of the disease, showing positive animals in the chronic phase, and was preferred in routine diagnosis. The AGID associated to clinical examination are indicated in the diagnosis of the disease and the result of positive animals in one or other method could be considered indicative of *B. ovis* infection.

Key Words: Agar gel immunodifusion test, serum agglutination test, sheep, brucellosis, clinical signs, serology, experimental inoculation

INTRODUÇÃO

A brucelose ovina cujo agente etiológico é *Brucella ovis*, é uma doença contagiosa caracterizada por epididimite, abortamentos e mortalidade perinatal de cordeiros. A transmissão ocorre através de pastos e fontes de água contaminadas, mas fundamentalmente durante a monta através de sêmen contaminado e da atividade homossexual entre machos¹. Os prejuízos econômicos causados pela enfermidade são representados por diminuição da fertilidade dos carneiros, abortos não muito freqüentes e elevada perda perinatal^{2,3}.

As manifestações clínicas mais importantes nos carneiros são epididimite e a diminuição da fertilidade devido à má qualidade do sêmen, fatores utilizados para diagnóstico e que servem como base para eliminação de reprodutores de alto valor genético. No entanto, nem todos os animais apresentam lesões testiculares⁴, apenas 30% dos carneiros infectados apresentam epididimite, os demais carneiros possuem testículos e ejaculados

de aparência normal, constituindo-se em fontes de infecção por eliminarem a bactéria pelo sêmen de forma intermitente⁵. Eliminação da bactéria tem sido demonstrada na urina tão eficientemente como no sêmen e secreções genitais^{6, 7}, mas não existem estudos demonstrando o período de eliminação da bactéria na urina⁸.

A fase aguda caracteriza-se por diminuição da qualidade do sêmen, inflamação aguda com edema do escroto, epidídimo ou testículo⁹. Atrofia testicular em graus variáveis, fibrose e aderências do epidídimo são características da infecção crônica².

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado com a combinação de exame clínico, isolamento da bactéria em amostras de sêmen, tecidos, descargas vaginais e leite de animais infectados^{10, 11} e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo¹². Entretanto, diagnóstico clínico somente pela palpação escrotal é difícil¹³ devido a presença de alterações que são apenas indicativas de infecção, podendo ser decorrentes de outras bactérias causadoras de epididimite¹⁴. Animais que excretam ativamente *Brucella ovis* podem nunca desenvolver lesões e carneiros incubando a doença podem eliminar a bactéria antes de desenvolver lesões visíveis¹⁵.

Vários estudos sorológicos utilizando *B. ovis* como antígeno foram relatados obtendo-se animais sororeagentes em vários estados brasileiros¹⁶⁻²⁰. Alguns autores têm relatado resultados discrepantes entre a sorologia e bacteriologia²¹⁻²³. Recomenda-se que em infecções subclínicas, para se considerar um animal negativo, além do exame clínico seja realizado exame sorológico e/ou bacteriológico de sêmen¹⁹. O histórico do rebanho e o quadro clínico também devem ser considerados na interpretação dos resultados dos testes sorológicos^{12, 17}.

Além disso, resultados falso-positivos podem ocorrer nos métodos sorológicos devido a reações cruzadas com outras bactérias que possuem determinantes antigênicos semelhantes ao da *B. ovis*, entre elas estão a *B. canis*, espécies mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus sp*, e *Bordetella bronchiseptica*²⁴⁻²⁶.

Os métodos sorológicos mais aplicados são a fixação de complemento (FC), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e os testes imunoenzimáticos (ELISA)²⁷, os quais apresentam certas limitações; a IDGA apresenta baixa

sensibilidade e requer considerável quantidade de antígenos e a FC é muito complexa, podendo apresentar fenômenos de prozona, atividade anti-complementar e incompatibilidade com soros hemolisados, estas provas vem sendo amplamente substituídas em nível internacional pelo teste de ELISA²⁸, porém já foram relatados animais negativos ao ELISA e que excretavam a bactéria²¹, sendo recomendado à utilização desta técnica associada ao IDGA por possibilitar resultados mais confiáveis¹⁹.

A IDGA geralmente utiliza antígeno de parede celular ou citoplasmático de *B. ovis*, apresentando elevada concordância com os exames bacteriológicos²⁹. Esse método utilizando antígeno de parede celular é capaz de detectar a presença de anticorpos a partir da 6ª semana após a infecção podendo os mesmos persistir por muitos anos^{24, 30}. Os títulos de anticorpos permanecem altos enquanto persiste a bacteremia. Quando a bacteremia torna-se intermitente, os títulos de anticorpos séricos declinam e podem tornar-se duvidosos ou negativos, enquanto o microrganismo ainda persiste nos tecidos. Em alguns casos, há flutuações nos títulos de anticorpos na presença ou na ausência de bacteremia²⁴. A IDGA utilizando antígeno protéico citoplasmático é altamente específico para a infecção por *B. ovis* ou *B. canis*^{24, 31}, contudo, a sensibilidade é baixa do início da 8ª até a 12ª semana de infecção, sendo o teste hábil em detectar infecção crônica^{24, 30}.

O teste de soroaglutinação rápida (SAR), que utiliza antígeno de cultura de células de *B. ovis* mortas coradas com rosa bengala, é comumente utilizado no diagnóstico da brucelose canina causada por *B. canis*, os anticorpos são detectados a partir da 3ª-4ª semana da infecção, sendo considerado um teste altamente sensível, pois detecta animais recentemente infectados, porém possui baixa especificidade^{32, 33}.

A utilização de um antígeno de *B. canis* (M-) na detecção de anticorpos contra *B. ovis* em soro de ovinos, foi verificada em 32 soros de um rebanho infectado, na qual 32 (100%) dos animais foram reagentes a SAR e 31 (97%) reagentes a IDGA, tendo 21 (66%) dos animais apresentando lesões clínicas¹⁴.

Com isso os objetivos do presente estudo foram, determinar o perfil sorológico após inoculação experimental de ovinos com *B. ovis*, utilizando a IDGA e SAR e associá-lo aos sinais clínicos, visando caracterizar as fases de maior eficácia nos exames sorológicos. Adicionalmente avaliar a SAR (DTec-

CB) como teste diagnóstico para brucelose ovina, assim como, analisar o método de avaliação clínica e o efeito dos métodos nas várias fases da doença experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu, no período de 2004-2007.

Inóculo: Utilizou-se a cepa *B. ovis* **REO 198**, liofilizada, obtida do Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”. FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS.

Animais: Foram utilizados 31 carneiros, com 1-2 anos de idade, da raça Santa Inês, submetidos à inoculação de 50µL via conjuntival e 2mL via intraprepucial de uma solução contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis*. Todos os animais inoculados foram previamente submetidos à colheita de sangue para análise sorológica e exame clínico, resultando negativos aos testes. Após a inoculação, os animais foram submetidos à colheita de sangue e avaliação clínica semanal.

Colheita de sêmen: O sêmen de cada animal foi obtido por eletroejaculação³⁴.

Colheita de urina: Urina foi colhida semanalmente para posterior cultivo microbiológico e PCR, por meio de bloqueio da respiração do animal por 30 segundos a um minuto, após o que o animal urinava espontaneamente.

Colheita e obtenção do soro: O sangue foi colhido através de venopunção jugular utilizando-se sistema a vácuo, estéril, sem anticoagulante (Vacuttainer), retirando-se, aproximadamente, 10mL de sangue por animal. Esse material foi mantido em posição de descanso por, no máximo, 24 horas, para a formação do coágulo, visando à obtenção do soro, o qual era aliqotado em eppendorfs e armazenado a -20°C até o momento de processá-los.

Cultivo e Isolamento de *B. ovis*: Sêmen e urina de todos os animais foram semeados, no mesmo dia em que foram colhidas, em placas com meio de Thayer-Martin modificado e ágar Brucella Sangue³⁵. As placas foram incubadas em atmosfera de 10% CO₂, por aproximadamente, 3-7 dias, em estufa a 37°C. As colônias suspeitas foram identificadas por coloração de Ziehl-Neelsen e Gram, testes de urease e catalase positiva, oxidase negativa, ausência de produção de H₂S, redução de nitrato para nitrito e crescimento na presença de tionina e fucsina básica³⁶.

Provas Sorológicas

1. **Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)**: Para a prova de IDGA foi utilizado kit de imunodifusão em gel de ágar com antígeno de *B. ovis*, constituído de parede celular bacteriana, produzido pelo Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”. O preparo do gel foi realizado de acordo com as recomendações do Instituto Tecnológico do Paraná – TECPAR, utilizando-se gel 1% em tampão borato, soro controle positivo e negativo. A reação ocorreu a 25°C em câmara úmida, com leitura em 24, 48 e 72hs.

2. **Soroaglutinação Rápida**: A SAR foi realizada utilizando-se o kit comercial D-Tec®CB com antígeno constituído de parede celular da *B. ovis*, inativada e corada com rosa bengala. Produzido pela Pitmam-Moore, EUA (Synbiotics Corporation-San Diego-USA), adquirido através da Intertec International Importação e Exportação Ltda, com prévia autorização do MAPA. Adicionou-se 30 µL do antígeno a 30µL do soro e homogeneizou-se por 10 segundos formando um círculo de aproximadamente dois cm de diâmetro, após o qual foi mantido em repouso por dois minutos. Ao final do tempo da reação, considerou-se positiva a presença de grumos e negativa a ausência.

Exame clínico dos animais: Todos os machos foram submetidos ao exame clínico semanal com medição do perímetro escrotal e palpação dos testículos e epidídimo. O tamanho do órgão foi avaliado por meio de paquímetro, realizando-se medidas de largura e comprimento. Foram observadas também variação na consistência e grau de firmeza, assim como, a presença ou ausência de atrofia do órgão avaliado. De acordo com o relatado por outros

pesquisadores foi considerado como fase aguda da doença o período caracterizado por inflamação aguda com edema do escroto, epidídimo ou testículo⁹ e a fase crônica a partir do momento em que os animais apresentaram endurecimento do epidídimo, atrofia testicular em graus variáveis, fibrose e aderências do epidídimo².

Análise estatística: Para análise dos resultados os animais foram classificados em positivos e negativos nos testes de SAR e IDGA, sendo avaliada a associação entre os resultados das provas. Foram consideradas somente as semanas que apresentavam resultados em um ou outro teste sorológico. A proporção de concordância entre os testes de SAR e IDGA foi calculada através dos limites de concordância máximo e mínimo entre as provas para cada semana, considerando-se, com isso, os limites de 95% de confiança³⁷.

RESULTADOS

Títulos de anticorpos foram detectados em 16 (52%) animais ao teste de IDGA e em 25 (80%) na SAR logo nos primeiros 15 dias pós-inoculação. Percentual de positividade máximo foi observado na 2ª semana para SAR e na 3ª semana para IDGA. A SAR detectou um maior número de animais na 1ª e 2ª semanas pós-inoculação, com um percentual decrescendo de 80-11% de animais positivos da 1ª a 7ª semana, detectando sete animais positivos na 14ª semana e um animal positivo na 23ª e 34ª semana. Entretanto, apesar do percentual de positivos da IDGA ter sido inferior ao da SAR da 1ª a 3ª semana, a IDGA detectou um maior percentual de animais, que variou de 45% a 6%, no decorrer das semanas estudadas, detectando animais reagentes de forma constante até a 18ª semana pós-inoculação, apresentando novos positivos da 22ª semana à 26ª semana e positividade em um animal na 32ª semana.

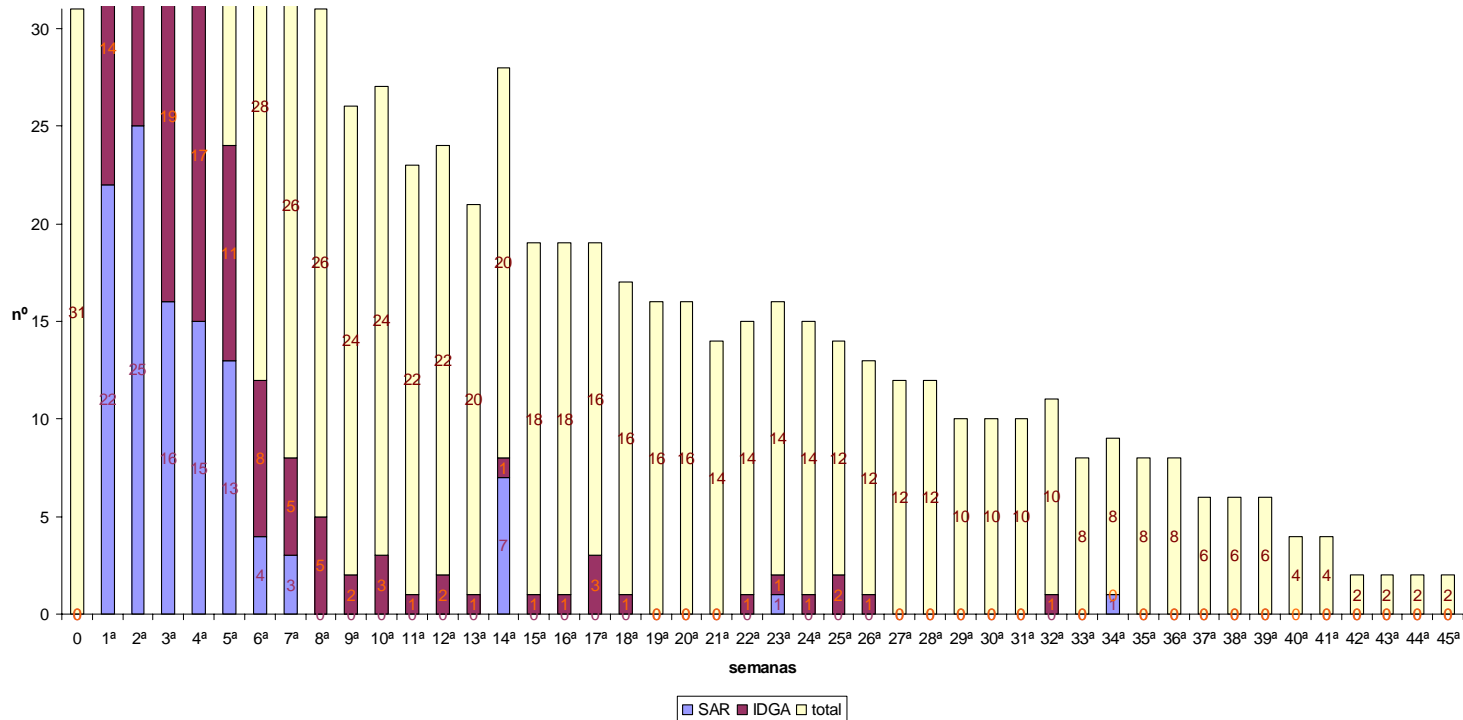


FIGURA 5. Número de animais positivos nos diferentes testes sorológicos de ovinos inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198 em diferentes fases. Botucatu-SP, 2004-2007.

Com relação às alterações clínicas, observou-se percentual crescente de animais com alterações clínicas, que se iniciou na 1ª semana pós-inoculação, com pico máximo entre a 11ª (82%) e 13ª semana (80%), decaindo logo após na 14ª semana (25%) e atingindo novamente um pico máximo entre 17ª e 19ª semanas (100%) e declinando rapidamente após a 23ª semana. Até os 60 dias após a inoculação as principais alterações clínicas apresentadas pelos animais envolviam somente o epidídimo, 70% (22 animais) apresentavam alterações unilaterais do órgão e 13% (4 animais) lesões bilaterais, sendo as principais características aumento de tamanho do órgão, aumento de consistência e endurecimento do órgão. Dos 60 dias aos seis meses após a inoculação, foram observadas lesões testiculares em 35% (9 animais) e em 27% (7 animais) notou-se a presença de atrofia epididimária unilateral. Entre os seis meses e 10 meses, 28% (4 animais) apresentaram atrofia epididimária esporadicamente. Aos 10 meses após inoculação, 75% (6 animais) restantes apresentavam-se sem alterações, porém no final do 12º mês voltaram a apresentar alterações clínicas. Desta forma, o período considerado como fase aguda neste experimento, desenvolveu-se na 1ª à 4ª semanas pós inoculação, a partir da qual foi então evidenciada a fase crônica (Fig.6).

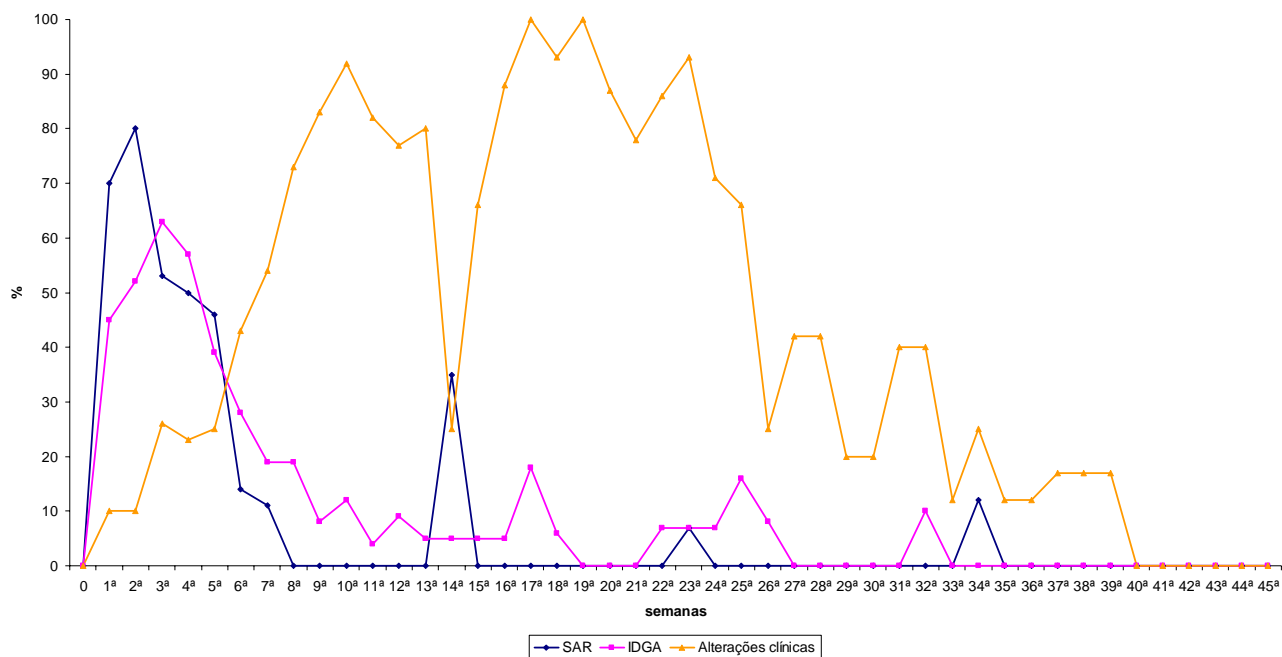


FIGURA 6. Percentual de animais positivos nos diferentes testes sorológicos correlacionados com o percentual de alterações clínicas de ovinos inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198 em diferentes fases. Botucatu-SP, 2007.

A análise dos limites de concordância, considerando-se um limite de 95% de confiança, entre as provas de SAR e IDGA nas diferentes semanas, demonstrou aumento gradativo de proporção de concordância entre as provas com a evolução da enfermidade, finalizando na 34ª semana quando não se detectaram mais animais positivos (Fig. 7).

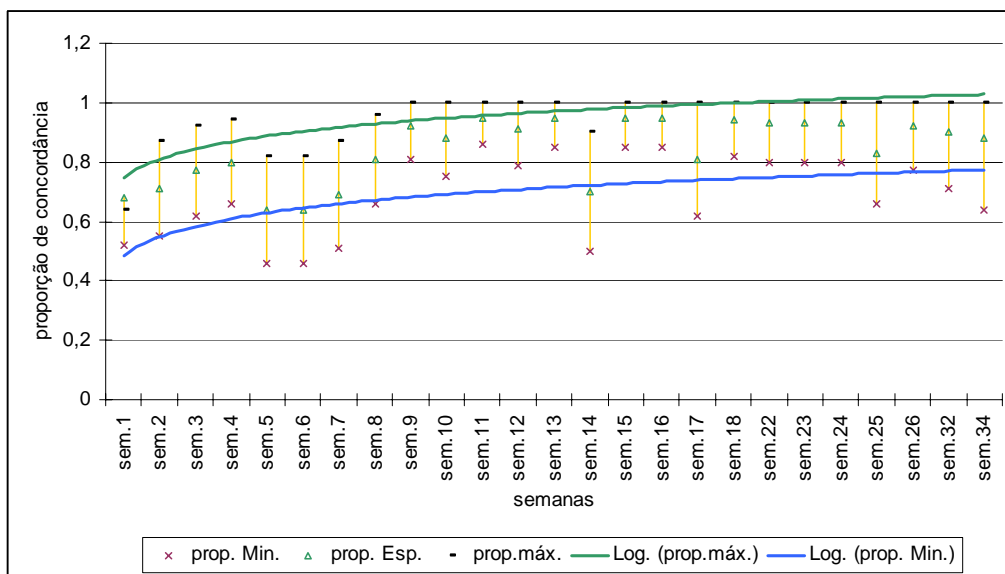


FIGURA 7. Limites de concordância entre as provas sorológicas de SAR e IDGA nas diferentes semanas de soros de carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

DISCUSSÃO

Desenvolvimento de títulos foi observado no presente estudo, tanto na SAR quanto na IDGA, a partir da 1ª semana pós-inoculação, permanecendo variável ao longo dos períodos, demonstrando flutuações de títulos em percentual de animais por ambas as provas. Resultados concordantes foram observados em 10 animais inoculados experimentalmente pela via intraprepucial, no qual os títulos sorológicos se desenvolveram a partir da 2ª semana pós-inoculação com presença de títulos flutuantes em alguns animais³⁸, também foram concordantes com outros pesquisadores que observaram o desenvolvimento de títulos 2-9 semanas após inoculação em 36/41 animais inoculados experimentalmente por meio de reação de fixação de complemento, esses títulos geralmente se desenvolviam mais cedo nos animais que eram expostos pela via intraprepucial quando comparado com outras vias³⁹.

No presente estudo, o teste de IDGA realizado, utilizou antígeno de parede celular de *B. ovis*, detectando 23/31 (74,1%) dos animais inoculados experimentalmente, principalmente na fase inicial da enfermidade. Concordando com o já relatado sobre a variabilidade dos resultados dependendo do antígeno empregado, principalmente antígenos de parede celular que são hábeis em detectar animais na fase aguda da doença^{24, 30}. Os antígenos utilizados nas provas sorológicas são compostos por proteínas de membrana externa e LPS rugoso. Embora estas proteínas contenham propriedades imunodominantes, nenhum teste baseado em antígenos extraídos por salina quente (HS) permite detectar todos os animais infectados sendo a sensibilidade e especificidade dos testes variável dependendo da origem das amostras, de infecção natural ou experimental⁴⁰.

Neste estudo, embora o percentual de detecção da IDGA foi inferior ao da SAR, a IDGA apresentou sensibilidade superior de detecção ao longo dos períodos das colheitas, o que pode ser justificado pelo limiar de detecção da técnica que se evidenciou também por maior período de detecção. Deve-se considerar que o limiar de detecção das provas de precipitação é superior ao da aglutinação, detectando um mínimo de 30 µg de anticorpos/mL, frente à aglutinação que detecta 10,05 µg/mL⁴¹. Os resultados positivos à SAR e negativos à IDGA podem ser justificados pela menor sensibilidade da IDGA na

detecção da fase aguda da doença. Contrariamente, os resultados positivos à IDGA e negativos à SAR poderiam ser decorrentes da detecção de animais cronicamente infectados pela IDGA²⁶.

Na análise estatística foram calculados os limites de concordância entre as provas sorológicas de SAR e IDGA nas diferentes semanas, observando-se que a concordância entre as provas aumentava conforme a doença progredia para fase crônica, demonstrando que ambas as provas apresentam mesmo perfil na detecção dos títulos de anticorpos desenvolvidos durante a enfermidade. Ausência de positividade nos métodos sorológicos a partir da 32ª semana pós-inoculação pode ser justificada por ausência de anticorpos nos animais em função da persistência da bactéria no trato reprodutivo do macho e não estado de resposta imune³³.

Alterações clínicas foram observadas em 25 animais dos 31 inoculados experimentalmente, sendo as principais características aumento de tamanho do órgão, aumento de consistência e endurecimento do órgão, com alguns animais apresentando lesões testiculares e até atrofia epididimária unilateral. As alterações iniciaram-se a partir da 1ª semana pós-inoculação, porém, maior número de animais apresentando alterações clínicas foi observado a partir da 9ª semana, com períodos de declínios, mas permanecendo bastante elevados até 25ª semana. Resultados concordantes foram observados por outros autores, com detecção de lesões clínicas logo após três semanas de inoculação e em todos os animais por oito semanas³⁸.

As alterações observadas no presente estudo foram variáveis, sendo observado o retorno à normalidade após algumas semanas, concordantes com outros trabalhos que relatam que animais infectados apresentando epididimite palpável podem freqüentemente retornar ao normal à palpação clínica em poucas semanas³⁹. As alterações desenvolvidas pelos animais na fase aguda e crônica da doença apresentaram-se de forma variável, mas foram concordantes com o relatado por diversos autores^{2, 9, 42}.

A análise das provas sorológicas com o exame clínico demonstrou que o maior número de animais apresentando alterações clínicas foi observado a partir da 8ª semana pós-inoculação período nos quais os títulos sorológicos começaram a declinar. Desta forma, a utilização associada da IDGA ao exame clínico resultaria em resultados mais confiáveis, uma vez que, somente o uso

do exame clínico a partir da 7ª semana foi suficiente para caracterização dos animais enfermos, porém não permite, na rotina, diagnosticar a enfermidade no início do desenvolvimento e também excluir enfermidade por outros agentes infecciosos como *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. pyogenis*, *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphilococcus* spp⁴³⁻⁴⁶.

As provas sorológicas apresentaram boa sensibilidade na fase aguda da doença, período em que menos de 50% dos animais apresentavam alguma alteração clínica. As alterações clínicas se desenvolveram a partir da 7ª a 8ª semana características da fase crônica, momento em que os títulos sorológicos começaram a decair ou desapareceram completamente como na prova de soroaglutinação rápida. Outros autores estudando 110 animais de 13 rebanhos detectaram 30,9% animais com sorologia e alterações clínicas causadas por *B. ovis*⁴⁷. Na presente pesquisa, pode-se observar que o maior percentual de animais com alterações clínicas, na fase crônica, foi relacionado ao maior percentual de resultados negativos nos testes sorológicos demonstrando que a utilização do exame sorológico isoladamente não diagnosticaria todos os animais que se caracterizam como fontes de infecção em potencial. A ausência de sorologia positiva na fase crônica da enfermidade e ausência de alterações clínicas nos animais que retornaram ao normal são concordantes com outros autores que afirmam não haver associação entre epididimite clínica e sorologia positiva^{42, 48, 49}.

Os resultados encontrados neste estudo concordam com o já relatado por muitos autores sobre a necessidade da associação de métodos sorológicos e exame clínico no diagnóstico da brucelose ovina^{2, 10, 12, 16}.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a prova de SAR apresenta maior sensibilidade nas primeiras semanas pós-infecção. Porém, seu uso não é indicado como diagnóstico de rotina devido à capacidade de diagnosticar apenas animais na fase aguda da doença, podendo assim não detectar animais assintomáticos que se encontrem na fase crônica.

Os anticorpos após inoculação experimental, se desenvolveram logo na 1ª semana e se mantiveram detectáveis por percentual variável de 30-40% até 6ª semana, decrescendo a partir de então com períodos de negatividade e

positividade máxima de 20%, contrariamente os sinais clínicos atingiram 100% dos animais com os picos entre a 11^a-25^a semanas, mantendo-se com percentual de 10-20% na fase final de observação.

Apesar da IDGA ter apresentado uma sensibilidade variável ao longo dos períodos, conseguiu detectar animais positivos na fase crônica da doença, demonstrando ter sido a mais favorável no uso como diagnóstico de rotina. Entretanto a utilização da IDGA associada ao exame clínico não foi eficaz quando os animais se apresentavam na fase crônica da enfermidade, demonstrando que somente a utilização do exame clínico seria indicativo de animais infectados. Porém, uma vez que não se pode detectar em que fase da doença o animal se apresenta, o uso associado da IDGA e exame clínico, poderia ser utilizado no diagnóstico da enfermidade e o achado de animais positivos em um ou outro método poderia ser considerado indicativo de infecção por *B. ovis* sendo necessário, em casos de sorologia negativa e clínica positiva a confirmação diagnóstica por outros meios como o bacteriológico ou técnicas de biologia molecular, adicionalmente à avaliação epidemiológica.

REFERÊNCIAS

1. QUISPE, R. Ch.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.13, n.1, p.61-66, 2002.
2. BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990a. p.351-378.
3. BAIGUN, R.; CONIGLIARO, A.S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serologicos en epididimitis ovina. *Vet. Argent.*, Buenos Aires, v.17, n.162, p.102-107, 2000.
4. NAREZ, G.M. ; APARICIO, E.D.; ÁLVAREZ, J.F.M. et al. Epididimitis ovina : estudios bacteriológico y serológico. *Vet. Méx.*, v.30, n.4, p.329-336, 1999.
5. MANAZZA, J. Brucelosis ovina. Buenos Aires: INTA, 2005. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/gsa.htm>. Acesso em: 15 jun. 2007.
6. BASSI, S.D. ; CERRI, D. ; BROUSSARD, A. et al. Epididimite del montone da *Brucella ovis* in Lombardia : Rilievi sierologici e batteriologici. *Selez. Vet.* v.11, p.845-855, 1988.
7. GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M. et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Record*, v.144, p.555-558, 1999.
8. HODGEN, G., EVANS, D. Ovine brucellosis. Austrália: FARMNOTE, 1996. Disponível em: <http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/1996/f01096.htm>. Acesso em: 14. ago. 2006.
9. RAMOS, A. A.; MIES FILHO, A.; SCHENCK, J.A.P. et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. *Pesqui. Agropec. Bras.*, v.1 p.211-213, 1966.

10. BLASCO, M.J.M. Epidemiologia, patogenia y cuadro clínico. En: BLASCO, M.J.M., MORIYÓN, U.I., editores. Brucelose ovina. Tratado de patologia y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, p.25-32, 1990a.
11. BLASCO, M.J.M. La epididimitis contagiosa del morrueco. En: BLASCO, M.J.M., MORIYÓN, U.I., editores. Brucelosis ovina. Tratado de patologia y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, p.89-96, 1990b.
12. ALTON, G.G., JONES, L.M.; ANGUS, R.D. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988, 109p.
13. GOMES, M.J.P. *Brucella ovis*. In: *Brucella spp. Microbiologia Clínica – LABACVET*, v.2, p.16-28, 2007.
14. LÓPEZ, G.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I. et al. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, v.105, n.3-4, p.181-187, 2005.
15. KIMBERLING, C.V.; ARNOLD, K.S.; SCHWEITZER, D.J. et al. Correlation of the presence of seminal white blood cells and the 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.
16. MAGALHÃES NETO, A.; GIL TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.16, p.75-79, 1996.
17. 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.
18. SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S. et al. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciênc. Anim.*, v.13, n.1, p.51-54, 2003.
19. NOZAKI, C. N. *Inquérito sorológico de brucelose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo, através das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA*. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
20. AZEVEDO, S.S.; ALVES, J.C.; ALVES, F.A.L. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Agropec. Téc.*, v.25, n.2, p.45-50, 2004.
21. BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, v.196, n.2, p.313-5, 1990.
22. ROJAS, X.; ALONSO, O.; URIBE, C. et al. Diagnóstico de brucelosis ovina por técnica de enzimoimunoensayo en papel de nitrocelulosa. *Arch. Med. Vet.*, v.22, n.2, p.135-142, 1990.
23. DÉNES, B.; GLÁVITS, R. Bacteriologically confirmed cases of ovine epididymo-orchitis caused by *Brucella ovis* in Sub-Carpathia. *Acta Vet. Hung.*, v.42, n.1, p.25-33, 1994.
24. JOHNSON, C.A., WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 14, p. 763-72, 1992.
25. GREENE, C.E. Moléstias Bacterianas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Eds). *Tratado de medicina interna veterinária*. 4.ed. São Paulo: Manole, p.534-535., 1995.
26. CARMICHAEL, L.E., SHIN, S.J. Canine Brucellosis: A diagnostician's dilemma. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.*, v. 11, p. 161-5, 1996.
27. ROBLES, C.A. Brucelosis de los carneros. *Rev. IDIA*, v.21, n.7, p.83-86, 2004. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/ovinos.htm>. Acesso em: 02.jun.2007.

28. RUELAS, D.C., ROSADIO, R.A. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis ovina. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.10, n.2, p.43-55, 1999.
29. NICOLETTI, P., CHASE, A. An evaluation of methods to diagnose *Brucella canis* infection in dogs. *Comp. Small Anim.*, v. 9, p. 1071-3, 1987.
30. CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K, DUNCAN, J. R. *Animal brucellosis*. Boston: CRC Press, 1990. cap. 14, p. 335-50.
31. ZOHA , S.J.; CARMICHAEL, L.E. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). *Vet. Microbiol.*, v.7, p. 35-50, 1982.
32. GEORGE, L.W.; CARMICHAEL, L.E. Development of a rose Bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet.*, n.68, p.530-543, 1978.
33. CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. (ED). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p.248-257.
34. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia, 1990. 192p.
35. 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.
36. ALTON, G. G. *Brucella canis*. In:_____. *Las técnicas de laboratorio en la brucellosis*. Geneva: OMS, p. 161-5., 1976.
37. NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. *Biostatistics: the base essentials*. St. Louis: Mosby Year Book,1994. 260p.
38. 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. 172-5, 1980.
39. PLANT, J.W.; EAMENS, G.J.; SEAMAN, J.T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.
40. EISTEN, S. M.; BALDI, P.C.; BOWDEN, R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.14, n.5, p. 407-411, sep. 2002.
41. MATUKUMA, C. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Testes sorológicos na clínica de pequenos animais. *Rev. Clínica Vet.*, ano 2, n.8, p.20-23, 1997.
42. HUGHES, K. L.; CLAXTON, P. D. *Brucella ovis* infection. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.*, v.44, p.41-47, 1968.
43. BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.
44. BAGLEY, C.V. ; BURRELL, W.C. ; ESPLIN, G.M. et al. Effect of epididymitis on semen quality of rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.185, n.8, p.876-877, 1984.
45. 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. Assoc.*, v.188, n.4, p.393-396, 1986.
46. DELONG, W.J., WALDHALM, D.G., HALL, R.F. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, n.1, p.101-102, 1979.

47. 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.
89. WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; 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.
49. MCGOWAN, B. Epididymitis in rams: effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease. *Cornell Vet.*, v.69, p.67-72, 1979.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) O potencial infectante e patogênico da cepa *B. ovis* REO 198 foi demonstrado pelo desenvolvimento de sinais clínicos nos animais experimentalmente e naturalmente infectados, eliminação da bactéria pelo sêmen e urina e desenvolvimento de sorologia positiva ao teste sorológico.
- 2) A excreção da bactéria pelo sêmen e urina dos animais infectados, de forma intermitente, iniciando-se aos 15 dias e ocorrendo durante os oito meses de observação do experimento. Os carneiros infectados se constituem fonte de infecção a partir dos 15 dias, mantendo-se durante período mínimo de oito meses.
- 3) Os resultados encontrados reforçam o potencial do sêmen e urina dos animais infectados como vias de eliminação e a condição destes como potenciais fontes de infecção.
- 4) Os anticorpos após inoculação experimental, se desenvolveram logo na 1ª semana e se mantiveram detectáveis por percentual variável de 30-40% dos animais até a 6ª semana, decrescendo a partir de então com períodos de negatividade e positividade máxima de 20%, contrariamente os sinais clínicos atingiram 100% dos animais com os picos entre a 11ª-25ª semanas, mantendo-se com percentual de 10-20% na fase final de observação.
- 5) O perfil sorológico da infecção experimental por *B. ovis* é caracterizado por flutuações de anticorpos durante o desenvolvimento da enfermidade.
- 6) A IDGA apresentou sensibilidade variável ao longo dos períodos, porém detectou animais positivos na fase crônica da doença, sendo mais favorável no uso como diagnóstico de rotina.
- 7) A SAR não é indicada no uso como diagnóstico de rotina, devido à capacidade de diagnosticar apenas animais na fase aguda da enfermidade.

- 8) Baixo percentual de positividade a IDGA foi observada na fase crônica a qual se caracterizou por alterações clínicas. A associação da IDGA ao exame clínico poderia ser utilizado e o achado de animais positivos em um ou outro método poderia ser considerado indicativo de infecção por *B. ovis*.
- 9) As adaptações realizadas na técnica de PCR utilizada no presente estudo possibilitam a utilização da técnica na detecção de *B. ovis*. A utilização associada da PCR com cultivo bacteriano é recomendada, uma vez que proporciona um diagnóstico mais eficiente.
- 10) É necessária a repetição dos testes diagnósticos em casos de resultados negativos, em função da eliminação intermitente pelo sêmen e urina e pela flutuação de títulos de anticorpos.

ANEXOS

ANEXO A: RESULTADO DAS COLETAS

Tab.3. Resultados sorológicos obtidos nas diferentes provas correlacionado com o percentual de alterações clínicas de ovinos inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198 em diferentes fases. Botucatu - SP, 2007.

Semanas	Nº positivos (% sensibilidade)			Total animais/semana total
	SAR nº	IDGA nº	Alteração Clínica nº	
0	0	0	0	31
1 ^a	22 (70)	14 (45)	3 (10)	31
2 ^a	25 (80)	16 (52)	3 (10)	31
3 ^a	16 (53)	19 (63)	8 (26)	30
4 ^a	15 (50)	17 (57)	7 (23)	30
5 ^a	13 (46)	11(39)	7 (25)	28
6 ^a	4 (14)	8 (28)	12 (43)	28
7 ^a	3 (11)	5 (19)	14 (54)	26
8 ^a	0	5 (19)	19 (73)	26
9 ^a	0	2 (8)	20 (83)	24
10 ^a	0	3 (12)	22 (92)	24
11 ^a	0	1 (4)	18 (82)	22
12 ^a	0	2 (9)	17 (77)	22
13 ^a	0	1 (5)	16 (80)	20
14 ^a	7 (35)	1 (5)	5 (25)	20
15 ^a	0	1 (5)	12 (66)	18
16 ^a	0	1 (5)	16 (88)	18
17 ^a	0	3 (18)	16 (100)	16
18 ^a	0	1 (6)	15 (93)	16
19 ^a	0	0	16 (100)	16
20 ^a	0	0	14 (87)	16
21 ^a	0	0	11 (78)	14
22 ^a	0	1 (7)	12 (86)	14
23 ^a	1 (7)	1 (7)	13 (93)	14
24 ^a	0	1 (7)	10 (71)	14
25 ^a	0	2 (16)	8 (66)	12
26 ^a	0	1 (8)	3 (25)	12
27 ^a	0	0	5 (42)	12
28 ^a	0	0	5 (42)	12
29 ^a	0	0	2 (20)	10
30 ^a	0	0	2 (20)	10
31 ^a	0	0	4 (40)	10
32 ^a	0	1 (10)	4 (40)	10
33 ^a	0	0	1 (12)	8
34 ^a	1 (12)	0	2 (25)	8
35 ^a	0	0	1 (12)	8
36 ^a	0	0	1 (12)	8
37 ^a	0	0	1 (17)	6
38 ^a	0	0	1 (17)	6
39 ^a	0	0	1 (17)	6
40 ^a	0	0	0	4
41 ^a	0	0	0	4
42 ^a	0	0	0	2
43 ^a	0	0	0	2
44 ^a	0	0	0	2
45 ^a	0	0	0	2

Tab 4. Resultado do cultivo e isolamento das amostras de sêmen de 10 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

Isolamento de <i>B. ovis</i> nas amostras de sêmen dos animais										
Animal Tempo	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27
0										
15										
30										
2M										
3M										
4M										
5M										
6M										
7M										
8M										

* Os quadrados preenchidos são relativos aos cultivos e isolamentos positivos

Tab 5. Resultado do cultivo e isolamento das amostras de urina de 10 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

Isolamento de <i>B. ovis</i> em amostras de urina dos animais										
Animal Tempo	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27
0										
15										
30										
2M										
3M										
4M										
5M										
6M										
7M										
8M										

* Os quadrados preenchidos são relativos aos cultivos e isolamentos positivos

Tab 6. Resultado ao exame clínico dos 10 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

Alterações clínicas apresentadas pelos animais inoculados experimentalmente										
Animal Tempo	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27
0										
15										
30										
2M	3ED	3EE	3ED							
			3EE-3ED	3EE		3ED			3ED	
		2ED				3ED				3ED
3M	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	3ED	2ED	2ED		2EE-2ED
	2ED	2EE-2ED	1EE-2ED	1ED	2ED	1TE-1ED	2ED	2EE-2ED	2ED	2ED
	2ED	2EE-2ED	3EE-3ED	2ED	3EE-1ED	2EE-2ED	1TD-1ED	2EE-2ED	2EE-2ED	2ED
4M	2ED		1ED	2ED	2ED	2ED	1ED	2EE-2ED	3ED	2EE-2ED
							2ED	1ED		
	2ED	2EE	2ED	2ED		2ED	2ED	1EE-1ED	2EE	
5M	2ED	2ED	2ED	2EE-2ED	2ED	1ED	4EE	1EE-1ED	2EE	2EE-2ED
	1EE	2EE	2EE-4EE	3TE-2EE	2EE-2ED	1TE-1EE	2EE-1ED	2EE-1ED	2EE	2EE-2ED
	1EE	2ED	2EE-2ED	2ED	2EE	2EE	2EE	1EE	4ED	2EE-2ED
	1EE	2EE	3TE-2EE	2ED	1EE	1TE-2EE	2EE	2EE-1ED	2EE	2EE
6M	1EE-1ED	2EE	1EE-1ED	2ED	1EE	1TE-2EE	1EE	2EE	2EE	2EE
		2EE	2EE		2EE	1TE-2EE	2EE-2ED	2EE		2EE-1ED
	1ED	2ED	2EE	2ED		1TE-2EE	1EE	2EE	1EE	1EE
7M	1ED	2ED		2ED	4EE-2ED	2EE-2ED	1ED	2EE	4EE	2EE
		2EE		1ED	4EE-4ED	2EE-2ED	1EE	2EE-2ED	2EE	
			2EE	4EE	4EE	3TE-2EE		1TD	1ED	
8M	1EE			4EE	4EE					
				2EE-2ED	4EE	2ED		2ED		
	1EE			1EE	4EE					1EE
8M				1EE	4EE					
					4EE			2EE		
				2EE-4EE	4EE	4ED		2EE		
8M	2ED		4EE	4EE	4EE					

1= aumento de tamanho do órgão TE= testículo esquerdo
 2 = endurecimento do órgão TD= testículo direito
 3 = consistência firme ED = epidídimo direito (corpo, cauda e/ou cabeça)
 4 = Atrofia do órgão EE = epidídimo esquerdo (corpo, cauda e/ou cabeça)

Tab 7. Resultado da PCR das amostras de sêmen de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

		Resultado da PCR em sêmen dos animais																																		
Animal	Tempo	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27				
	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	30		N	N					N		N	N	N		N	N	N	N		N	N	N	N		N	N			N	N	N	N	N			
	2M				N	N									N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	3M							N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	4M												N	N																						
	5M																																			
	6M																																			
	7M																																			
	8M																																			
	9M																																			
	10M																																			
	11M																																			
	12M																																			

* Os quadrados preenchidos são relativos aos resultados positivos
 N = amostra negativa

Tab 8. Resultado da PCR das amostras de urina de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

		Resultado da PCR da urina dos animais																															
Animal	Tempo	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27	
	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2M				N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3M							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	4M											N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	5M																																
	6M																																
	7M																																
	8M																																
	9M																																
	10M																																
	11M																																
	12M																																

* Os quadrados preenchidos são relativos aos resultados positivos
 N = amostra negativa

Tab 9. Resultado do cultivo e isolamento das amostras de sêmen de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

Isolamento de <i>B. ovis</i> nas amostras de sêmen dos animais																																	
Animal	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27	13	33
Tempo																																	
0																																	
15																																	
30																																	
2M																																	
3M																																	
4M																																	
5M																																	
6M																																	
7M																																	
8M																																	
9M																																	
10M																																	
11M																																	
12M																																	

* Os quadrados preenchidos são relativos aos cultivos e isolamentos positivos

Tab 10. Resultado do cultivo e isolamento das amostras de urina de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

		Isolamento de <i>B. ovis</i> em amostras de urina dos animais																																		
Animal	Tempo	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27				
	0																																			
	15																																			
	30																																			
	2M																																			
	3M																																			
	4M																																			
	5M																																			
	6M																																			
	7M																																			
	8M																																			
	9M																																			
	10M																																			
	11M																																			
	12M																																			

* Os quadrados preenchidos são relativos aos cultivos e isolamentos positivos

Tab 11. Resultado da PCR e cultivo das amostras de órgãos de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

PCR	15	30	45	60	75	90	4M	5M	6M	7M	8M
L. Parotídeo											
L. Faríngeo											
L. Pré-Esc.											
L. Mediast.											
L. Mesent.											
L. Ing.											
Gl. Parot./Mand.											
Baço											
Fígado											
Pulm.											
Rim											
Bex.											
Test. D.											
Test. E.											
Ep. D.											
Ep. E.											
Ves.											
Bulbo											
Amp.											

CULTIVO	15	30	45	60	75	90	4M	5M	6M	7M	8M
L. Parotídeo											
L. Faríngeo											
L. Pré-Esc.											
L. Mediast.											
L. Mesent.											
L. Ing.											
Gl. Parot./Mand.											
Baço											
Fígado											
Pulm.											
Rim											
Bex.											
Test. D.											
Test. E.											
Ep. D.											
Ep. E.											
Ves.											
Bulbo											
Amp.											

* Os quadrados preenchidos são relativos aos resultados positivos

Tab 12. Resultado do diagnóstico sorológico de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198 ao teste de soroprecipitação rápida, 2004-2007.

		Resultado do diagnóstico sorológico a SAR																																			
Animal	Tempo	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27	13	33			
	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	15	N				N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	30		N	N	N	N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	2M				N	N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	3M						N	N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	4M								N	N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	5M										N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N
	6M												N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N
	7M														N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N		N
	8M																			N		N		N		N		N		N		N		N		N	
	9M																																				
	10M																																				
	11M																																				
	12M																																				

* Os quadrados preenchidos são relativos à sorologia positiva
 N = amostra negativa

Tab 13. Resultado do diagnóstico sorológico de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198 ao teste de imunodifusão em gel de ágar, 2004-2007.

		Resultado do diagnóstico sorológico a Imunodifusão em Gel de Ágar																																			
Animal	Tempo	1B	2B	4B	3B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27					
0		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
15		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
30		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
2M					N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
3M							N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
4M									N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
5M											N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
6M													N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
7M														N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
8M															N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9M																N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10M																	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11M																		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12M																			N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* Os quadrados preenchidos são relativos à sorologia positiva
 N = amostra negativa

Tab 14. Resultado ao exame clínico de 31 carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, 2004-2007.

		Alterações clínicas apresentadas pelos animais inoculados experimentalmente																															
Animal	Tempo	1B	2B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	6	32	18	28	12	31	7	23	5	24	17	34	10	A	29	30	19	27		
0																																	
15		3ED				2EE				3EE																							
30		3EE																															
		1EE	1EE							1EE	1EE	1EE		1EE																			
2M														3ED	2ED-4ED		1ED		1ED				3ED	3EE	3ED								
														3EE-2ED	3ED	3ED	3ED	1ED															
														2ED	2ED-1ED	3ED		1ED															
														2EE	2ED-1ED	2ED																	
														2ED-2EE	2TE-2EE-4ED	2ED	2EE-2ED	2EE-2ED	2ED	2EE-2ED	2EE-2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	
														1ED	2TETD-4ED	2EE-2ED	1TD-1ED	1ED	1EE-1ED	1ED-1EE	2ED	2ED	2EE-2ED	1EE-2ED	1ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	
3M														2ED-2EE	2EE-2ED	2EE-2ED	1ED	2EE-2ED	2EE-2ED	1EE-2ED	2ED	2ED	2EE-2ED	3EE-3ED	2ED	3EE-1ED-1TD	2EE-2ED	1TD-1ED	2EE-2ED	2EE-2ED	2ED		
														2ED	1TD-4ED	2ED	1EE-1ED	2EE-2ED		2ED-2EE	2EE-2ED	2ED	1ED	1ED	2EE-2ED	2EE-2ED	1ED	1ED	2ED	1ED	2ED	2ED	
														2EE	1TD-4ED		1ED	2EE-2ED	1ED	3ED	2EE-2ED	2ED		2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	
4M														1TD-4ED	2EE-2ED		2EE-2ED		2EE-2ED														
														2ED	1TD-4ED	2ED	2EE		2EE-2ED	2EE	2EE-2ED	2EE	2EE-2ED	2ED	2EE	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	
														2EE-2ED	3TE-1EE	2EE-2ED	1TE-2ED	2EE-1TE	2EE-2ED	2ED	2ED	2ED	2EE-4EE	3TE-2EE	2EE-2ED	1TE-1EE	2EE-1ED	2EE-1ED	2EE-1ED	2EE	2EE-2ED		
														2EE	2EE-2ED	2EE-2ED	2EE	2EE	1EE	2ED	2EE-2ED	2ED	2EE	2EE-2ED	2ED	2EE	2EE	2EE	2EE	2EE	2EE	2EE	
5M														2EE	2EE	1EE	1TE-2EE	2EE	3EE	1EE	2ED	2EE	3TE-2EE	2ED	1EE	1TE-2EE	2EE	1EE	4ED	2EE	2EE	2EE	
														2EE	2EE-2ED	2EE	2TE-4EE	1EE	2EE	1EE-1ED	2EE	2EE	2EE	1TE-2EE	2EE-2ED	2EE	1TE-2EE	2EE-2ED	2EE	2EE	2EE	2EE	
														2EE-2ED	2TE-4EE	2EE-1ED																	
6M														2ED	2TE-4EE	2ED	2ED	1ED	2ED	2ED	2ED	2ED	1ED	4EE-2ED	2EE-2ED	1ED	2EE	4EE	2EE	2EE	2EE	2EE	
														2ED	2TE-4EE-2ED	2EE	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	2ED	1ED	4EE-4ED	2EE-2ED	1EE	2EE-2ED	2EE	2EE	2EE	2EE	
														1ED	1ED									2EE	4EE	4EE	3TE-2EE	1TD	1ED				
																									4EE	4EE							
7M																									2EE-2ED	4EE	2ED		2ED				
																								1EE	4EE								
																									1EE	4EE							
8M																									2EE-4EE	4EE	4ED						
																									4EE	4EE							
																									4EE	4EE							
9M																									4EE	4EE							
																									4EE	4EE							
10M																									4EE	4EE							
																									4EE	4EE							
11M																																	
12M																																	

1= aumento de tamanho do órgão TE= testículo esquerdo
 2 = endurecimento do órgão TD= testículo direito
 3 = consistência firme ED = epidídimo direito (corpo, cauda e/ou cabeça)
 4 = Atrofia do órgão EE = epidídimo esquerdo (corpo, cauda e/ou cabeça)

rompimento das hemácias, agitando-se de vez em quando para uma hemólise total e homogênea, porém com cuidado para não formar espumas. Logo após abaixar a temperatura do banho para 50°C para poder acrescentar os antibióticos.

INÓCULO

Utilizou-se a cepa *B. ovis* **REO 198**, liofilizada, obtida do Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”. FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS. A cepa foi reconstituída com 1mL de água destilada estéril, semeando-se 0,1mL em placas de ágar Brucella sangue. Após crescimento das colônias, preparou-se uma suspensão concentrada de *B. ovis*, segundo escala de MacFarland a 10^{-9} , estimando que a suspensão apresentasse uma concentração de 2×10^9 UFC/mL. Diluiu-se a suspensão de 10^{-1} a 10^{-10} e semeou-se em placas de ágar Brucella sangue, na qual após 3-5 dias de incubação, foi realizado a contagem das UFC.

ANIMAIS

Foram utilizados no total 36 carneiros, com 1-2 anos de idade, da raça Santa Inês, submetidos à inoculação de 50µL via conjuntival e 2mL via intraprepucial de uma solução contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis*.

A inoculação via intraprepucial foi realizada com seringas de 5mL descartáveis. Inicialmente, fez-se uma escarificação na mucosa do prepúcio e a seguir inoculou-se 2mL da solução no saco prepucial. Com as pontas dos dedos, fechou-se a entrada do prepúcio para não escorrer o líquido e realizou-se massagem prepucial, por aproximadamente dois minutos.

COLHEITA DE SÊMEN

A anti-sepsia para a colheita foi realizada por meio de limpeza do prepúcio com gaze umedecida em solução de álcool a 20%, com a finalidade de evitar contaminação da amostra, seguida de exposição do pênis e fixação da glândula por meio de gaze, para realização da colheita. O sêmen de cada animal foi obtido por eletroejaculação, em tubo próprio de vidro graduado limpo e estéril, mantido a uma temperatura de 37°C, com estimulação elétrica intermitente até a obtenção de aproximadamente 1-2 mL de sêmen.

COLHEITA DE URINA

Previamente à colheita de urina, o prepúcio de cada animal foi limpo e higienizado com uma gaze umedecida com solução de álcool a 20%, visando evitar contaminação da amostra. A urina foi colhida por estresse do animal, por meio de bloqueio da respiração, por 30 segundos a um minuto, após o que o animal urinava espontaneamente. A amostra foi colhida em potes coletores descartáveis, estéreis e semeada imediatamente após a colheita.

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE PCR

SOLUÇÃO TRIS-HCL 1M PH 8,0

PM do Trisma base = 121,14

Para 1 litro:

Pesou-se 121,14g de trizma e adicionou-se 800ml de água destilada, ajustando o pH com HCl até 8,0. Completou-se o volume de água para 1 litro e autoclavou-se.

pH	HCl
7,4	70ml
7,6	60ml
8,0	42ml

SOLUÇÃO EDTA 0,5M PH 8,0

PM do EDTA = 372,24

Para 500mL;

Pesou-se 93,06g de EDTA, adicionando 250ml de água destilada e ajustando o pH com NaOH (\pm 10g de pellets) até atingir pH=8,0. Completou-se o volume de água com 500mL e autoclavou-se.

SOLUÇÃO NaCL 5M

PM do NaCL = 58,45

Para 500ml:

Pesou-se 146,15g de NaCL, completou-se o volume para 500ml com água destilada e autoclavou-se.

SOLUÇÃO TE (TRIS-EDTA)

Solução TE (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0)

Para preparação de 100mL, utilizou-se:

- 1mL de Tris-HCl 1M
- 200uL de EDTA 0,5M

- 98,80mL de água destilada.

Autoclavou-se a solução.

SDS 10%

Dissolveu-se 100g de SDS em 900ml de água destilada. Esquentou-se a 68°C para dissolução. Ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e ajustou-se o volume para 1 litro com água destilada.

TBE 10X

890 mM Tris Base ----- 108g

890mM ácido bórico ----- 55g

20mM Na₂EDTA ----- 8,3g

Completou-se com água MiliQ para 1L e misturou-se com agitador magnético até dissolução completa. Filtrou-se com membrana < 0,45um. Mediu-se o pH 8,2-8,6 e armazenou-se a temp. ambiente. A solução não era utilizada se o precipitado formava no fundo da solução.

TBE 5X

54g Tris-HCl

27,5g ácido bórico

20mL EDTA 0,5M pH 8,0

Completou-se com água MiliQ para 1L e ajustou-se o pH para 8,0.

Autoclavando logo após.

LADDER 100bp

70 uL água MiliQ.

20 uL corante (azul bromofenol).

10 uL ladder 100bp.

SOLUÇÕES PARA ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN

PBS pH 7,0

NaH₂PO₄ 8g q.s.p. 1000mL _____ 30mL

Na₂HPO₄ 9,47g q.s.p. 1000mL _____ 70mL

NaCl _____ 0,45g

Distribuiu-se 0,5mL em eppendorfs. Os reagentes do PBS foram rigorosamente pesados e o pH ajustado para 7,0, aceitando-se uma variação de 6,8-7,2, pois se ficasse acertando muito o pH, a solução poderia dar falsas patologias.

Formol Salina 0,2%

Formol _____ 0,2mL

PBS 7,0 _____ 100mL

Preparo do material para colheita

- Todo material utilizado foi preparado 1-2 dias antes.
- Preparou-se eppendorfs com 0,5mL de PBS 7,0 cada. Da solução mãe de PBS preparou-se uma solução de 0,2% de formol salina e distribuiu-se 0,5mL nos eppendorfs.
- Preparou-se os tubos para análise de concentração. (tubos de 10mL estéreis contendo 4mL de água destilada estéril, os tubos foram tampados com tampas de borracha para evitar evaporação).
- Antes de se iniciar a coleta todo material foi aquecido a 37°C em uma placa aquecedora (eppendorfs de PBS e de formol salina, lâminas e lamínulas utilizadas na análise e ponteiras).
- Antes da coleta do sêmen o prepúcio de cada animal foi limpo e higienizado com uma gaze umedecida com solução de álcool a 20%, para evitar possível contaminação da amostra no cultivo. O pênis do animal foi

exposto e a glânde do pênis envolvida com uma gaze, para fixação do órgão durante a colheita.

- O reto de todo animal foi limpo antes da colheita para uma maior superfície de contato da banana do eletroejaculador. O sêmen de cada animal foi colhido por eletroejaculação em tubo próprio de vidro graduado limpo e estéril, mantido a uma temperatura de 37°C, com estimulação elétrica intermitente até a obtenção de no mínimo 0,7 mL de sêmen.

- Após a colheita do sêmen (tubo foi colocado em banho maria), a amostra foi distribuída sempre na seguinte ordem: 10µL no eppendorf contendo só PBS, 10µL no tubo de concentração e 10µL no eppendorf com formol. (se a ordem fosse invertida poderia haver um prejuízo na análise, pois o formol paralisa os espermatozoides). Quando a amostra se apresentava muito cremosa colocava-se um pouco menos de 10µL no tubo de PBS e formol, para não prejudicar a análise. O único volume que tinha que ser preciso era o da concentração.

- Após a distribuição da amostra, foi verificado volume; aspecto (aquoso, leitoso ou cremoso); cor (marfim, branco, transparente, perolado, avermelhado) e floculação.

- Colheu-se 10µL da amostra diluída em 500µL de solução salina tamponada pH7,0 para análise imediata de motilidade e vigor.

- Para montagem das lâminas, distribuiu-se uma gota da amostra sobre a lâmina, formando um ângulo de 45° com a lamínula e sobrepondo-se lamínula-lâmina.

- Do tubo de PBS mais amostra, pingou-se uma gota do sêmen diluído em lâmina e lamínula aquecida a 37°C e avaliou-se a motilidade e vigor em aumento de 200x em microscópio de luz.

- Nos tubos preparados para concentração, diluiu-se 10µL da amostra de sêmen para posterior análise da concentração (contagem realizada em câmara de new Bauer, em aumento de 400x). Contou-se 5 quadrados na diagonal na área de cima e na área de baixo.

- Colocou-se 10µL em um eppendorf® contendo formol salina para caracterização das formas anormais, no qual, sob imersão, contou-se 100 espermatozóides e classificou-se em normais ou com anormalidades. As anormalidades espermáticas foram classificadas de acordo com Blom (1973).



Figura 8. Foto dos animais adquiridos no galpão cedido pelo departamento.



Figura 9. Demonstração da colheita de urina.



Figura 10. Exposição do pênis do animal para colheita de sêmen e momento da colheita de sêmen.



Figura 12. . Animal apresentando aumento de tamanho da cauda do epidídimo direito e aumento de tamanho da cabeça do epidídimo esquerdo.