

Cristiane Nakada Nozaki

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE OVINA EM CABANHAS
REGISTRADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO ESTADO DE SÃO
PAULO, ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE
ÁGAR E ELISA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, da
Universidade Estadual Paulista, Campus
de Botucatu, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária, Área de Vigilância Sanitária.

Orientadora: Prof^a. Dra. Jane Megid

Botucatu - SP

2003

DADOS CURRICULARES
CRISTIANE NAKADA NOZAKI

NASCIMENTO: 19.12.1973

FILIAÇÃO: Auria Nakada Nozaki
Hiroyuki Nozaki

1994/1999: Curso de Graduação: Medicina Veterinária - Universidade
Federal de Uberlândia/UFU.

Aos meus Pais

Que dedicaram toda sua vida para minha formação, que apoiaram e incentivaram todas as minhas decisões, ensinando-me sempre a trilhar no melhor caminho e às vezes deixaram de realizar seus sonhos para satisfazer os meus.

Ao meu marido Rogério

Que com seu carinho sempre me apoiou e incentivou-me ao sucesso. Que cultivou a paciência e compreensão nos momentos mais difíceis da minha vida e com seu amor ensinou-me a nunca desistir dos meus sonhos.

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.

À **Dra. Jane** Megid e sua família, pelo carinho, amizade e toda confiança depositada em mim, por tudo que me ensinou e colaborou para meu crescimento. Palavras são poucas para demonstrar meu agradecimento por tudo que têm feito por mim.

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 direta e indiretamente, contribuiu para minha formação, principalmente com seus “cursos de férias”. Muito obrigada por tudo.

Aos meus maravilhosos sobrinhos **Nathália, Victor Hugo, Sofia e Branco** e meu afilhado que está para vir ao mundo, pelos momentos alegres e descontraídos que sempre me proporcionam.

À minha "dinda do juízo" **Carla** Moraes e meu padrinho **Cláudio**, pela amizade, confiança e pelos conselhos carinhosos nos momentos difíceis de minha vida.

Às amigonas **Cristina** Haanwinckel, **Cristiane** e **Bianca** Santos Kuroda pela amizade e pelas deliciosas conversas e momentos de descontração e pelo inesquecível "chopp com groselha".

Aos meus grandes amigos **Cristina** Brito e **Leandro** Moretti, pelo carinho, amizade e apoio durante todo o meu mestrado.

Aos meus amigos pós-graduandos **Keila** Lima e Francisco Feliciano **Júnior**, por terem me apoiado e ajudado nas colheitas das amostras. Obrigada pela amizade e carinho nos momentos difíceis e alegres que passamos juntos.

Ao meu amigão **Nilson** Fava, que me ajudou nas colheitas das amostras e foi companheiro nas viagens, proporcionando momentos descontraídos e inesquecíveis. Principalmente nos incidentes acontecidos "peraí mano!".

Às sócias do "Clube da Gula", **Taís** Fukuta, **Érica** Tanaka e **Tatiana** Ueno, obrigada pelos maravilhosos momento em que passamos juntas, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos meus amigos **Satie** katagiri, **Lucinéia** Geronutti, **Wellington** Borges, **Fábio** Shimabukuro, **Joel**, **Amanda**, **André** e **Rodrigo** residente da zoonoses, pelo carinho e por todos momentos alegres em que passamos juntos.

Ao Prof. **Edson** Ramos Siqueira, por sua atenção e ajuda na realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao **Márcio** da ASPACO, que foi imprescindível no fornecimento dos dados dos proprietários.

Ao Prof. **Carlos Padovani** pelo auxílio e esclarecimento estatístico.

Aos **proprietários de ovinos**, por me receberem muito bem em suas propriedades e permitirem que fosse realizada as coletas nos animais.

À Dra. **Lília Márcia Paulin**, que me recebeu no Instituto Biológico e utilizou seu precioso tempo para me ensinar a técnica de Fixação de Complemento.

Aos funcionários **Wanderley Furlin, Sérgio, Seu Humberto e D. Geni** da limpeza, pela amizade, auxílio e paciência.

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

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

Às minha amáveis "filhas" **Pitita, Lilyca e Brida**, por todos momentos alegres e carinhosos que proporcionam em minha vida e que até nos momentos tristes souberam me dar alegria.

"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)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Pág.10
RESUMO	Pág.12
ABSTRACT	Pág.13
1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	Pág.14
2 – OBJETIVOS	Pág.26
3 – MATERIAL E MÉTODOS	Pág.28
3.1 – Material	Pág.29
3.1.1. – Animais	Pág.29
3.1.2. – Antígenos	Pág.29
3.2 – Técnicas	Pág.30
3.2.1 – Soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado	Pág.30
3.2.2 - Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar	Pág.30
3.2.3 - Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar modificada ..	Pág.31
3.2.4 – Teste de ELISA	Pág.31
3.3 – Delineamento Experimental	Pág.32
3.3.1 – Amostragem	Pág.32
3.3.2 – Colheita do Material	Pág.32
3.3.3 – Obtenção e Armazenamento do soro	Pág.33
3.3.4 – Provas Sorológicas	Pág.33
3.4 – Inquérito Epidemiológico	Pág.33
3.5 – Exame Clínico dos Animais	Pág.34
3.6 – Análise Estatística dos Dados	Pág.34
4 – RESULTADOS	Pág.35
4.1 – Resultados obtidos na Prova de Soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT)	Pág.36
4.2 – Resultados obtidos nos testes de ID s/ 2-ME, ID c/ 2-ME e ELISA	Pág.37
4.3 – Resultados Comparativos aos testes utilizados	Pág.40

4.4 – Análise Estatística	Pág.43
4.5 - Resultados do Inquérito Epidemiológico	Pág.44
4.6 – Resultado do Exame Clínico dos Animais	Pág.46
5 – DISCUSSÃO	Pág.47
6 – CONCLUSÕES	Pág.54
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág.56
8 – ANEXOS	Pág.64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Ovinos submetidos à prova de Imunodifusão em Gel de Ágar sem 2-mercaptoetanol (ID s/ 2-ME), aplicado ao diagnóstico de brucelose ovina por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003. Pág. 37
- Tabela 2 - Ovinos submetidos à prova de Imunodifusão em Gel de Ágar com 2-mercaptoetanol (ID c/ 2-ME), aplicado ao diagnóstico de brucelose ovina por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003. Pág.38
- Tabela 3 - Ovinos submetidos ao teste de ELISA, aplicado ao diagnóstico de brucelose ovina por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003. Pág.39
- Tabela 4 - Resultados comparativos obtidos na prova de ID s/ 2-ME frente à ID c/ 2-ME, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003. Pág.40
- Tabela 5 - Resultados comparativos obtidos na prova de ID s/ 2-ME frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003. Pág.41
- Tabela 6 - Resultados comparativos obtidos na prova de ID c/ 2-ME frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003. Pág.42

Tabela 7 - Limites de concordância entre as provas utilizadas, considerando o total de amostras de soros de ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo, Botucatu - SP, 2001-2003.

Pág.43

Tabela 8 - Resultados obtidos (total de amostras), quanto ao número de animais reagentes às provas sorológicas aplicadas no estudo, frente ao número de propriedades com histórico de abortos e/ou nascimento de crias fracas, em ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo, nos anos de 2001-2003.

Pág.45

NOZAKI, C.N. Inquérito Sorológico de Brucelose Ovina em Cabanhas Registradas da Região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, através das Técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar e Elisa, Botucatu, 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A brucelose ovina, causada pela *Brucella ovis*, é responsável por elevadas perdas econômicas, com enormes prejuízos para a produção de lã, carne, leite e fertilidade do rebanho. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a frequência de reações sorológicas para *Brucella ovis*, em ovinos de cabanhas da região Centro-Oeste do estado de São Paulo, que registram seus animais na Associação Paulista dos Criadores de Ovinos, correlacionando os resultados obtidos na imunodifusão em gel de ágar sem 2-mercaptoetanol (ID s/2-ME), imunodifusão em gel de ágar com 2-mercaptoetanol (ID c/ 2-ME) e ELISA, ao quadro clínico dos animais. Dos 1033 soros ovinos analisados, observou-se 12% de positivos a ID s/2-ME, 1,1% de positivos a ID c/ 2-ME e 6% de reagentes considerados suspeitos pela técnica de ELISA. Quando comparadas as provas de ID s/ 2-ME à ID c/ 2-ME e ID c/ 2-ME à ELISA, observou-se uma variação de 83,23 à 87,54% e 91,16 à 94,32%, respectivamente, de resultados concordantes. Uma vez que as reações no ELISA foram somente suspeitas, não se pode afirmar que os animais sejam positivos. Os melhores resultados, embora não estatísticos, foram observados com a ID s/ 2-ME e ELISA. A aplicação associada da ID s/ 2-ME ao ELISA deve ser incentivada para o diagnóstico da brucelose ovina, por possibilitar resultados mais confiáveis.

Palavra-chave: *Brucella ovis*, imunodifusão em gel de ágar, ELISA, brucelose ovina, 2-mercaptoetanol

NOZAKI, C.N. Serological enquiry of the ovine brucellosis in the breeding of the Midwest region from São Paulo State, by Agar Gel Immunodifusion and ELISA techniques. Botucatu, São Paulo State, 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Ovine brucellosis due to *Brucella ovis* is responsible to great economic losses related to milk and meat production and decrease in reproductive performances. The goal of this study is to evaluate the serological reactions frequency for *Brucella ovis* to Paulista ovine bear association registered sheep at the midwest region from Sao Paulo state, Brazil. Correlating the results of the immunodifusion in agar gel without 2-mercaptoethanol (ID s/2-ME), the immunodifusion in agar gel with 2-mercaptoethanol (ID c/2-ME), and ELISA to the clinic situation of the animals. From 1033 analyses of ovine sera, was observed 12% of positive at ID s/2-ME, 1,1% positives at ID c/2-ME and 6% considered reactive at ELISA techniques. When compared the ID s/2-ME tests to ID c/2-ME test, and ID c/2-ME to ELISA, was observed a variation from 83.23 to 87.54% and from 91.16 to 94.32% respectively, of concordant results. Once the reaction on ELISA was only suspected, we can't say that the animals were positives. The better results, although was not statistically was observed comparing ID s/2-ME and ELISA. The associated appliance of ID s/2-ME to ELISA should be incentivated to the diagnostic of ovine brucelosis for being possible more confieble results.

Keywords: *Brucella ovis*, agar gel immunodifusion, ELISA, ovine brucellosis, 2-mercaptoethanol.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa crônica comum a diversas espécies animais. Apresenta importância considerável sob o ponto de vista econômico, com enormes prejuízos para a produção de lã, carne, leite e fertilidade do rebanho. É causada pela *Brucella spp*, bactéria gram-negativa composta por uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa (ME) 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 *Brucella ovis*, espécie rugosa que é cultivada em ambiente de 10% de CO₂ para isolamento primário. A *B. ovis* produz doença clínica ou subclínica crônica em ovinos, caracterizada por epididimite e subsequente diminuição de fertilidade em carneiros; em ovelhas, causa abortos ocasionais. A existência de outras bactérias causadoras de epididimite clínica dificulta o diagnóstico apenas por palpação testicular (BLASCO e BARBERÁN, 1990).

Brucella ovis e a *Brucella canis*, que afeta caninos e humanos, 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 não lisas e organismos de outros gêneros não tem recebido a devida atenção, mas 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 ME de *B. ovis* contém 2 grupos de proteínas de membrana que se classificam em maiores e menores e se acham estreitamente unidas ao LPS-R. O primeiro grupo, denominadas grupo 2, são porinas e são formadas por proteínas de 36-38 Kda. O grupo 3, compostos por proteínas de 25-27 Kda e 31-34 Kda, encontram-se fortemente associadas ao peptidoglicano (EISTEN, 1999).

A resposta imune humoral em ovinos infectados naturalmente, apresenta-se principalmente contra o LPS-R e contra as proteínas de membrana do grupo 3, 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 uma maior estimulação antigênica (EISTEN, 1999).

A *B. ovis* infecta de forma natural exclusivamente a espécie ovina, sendo o macho mais suscetível à infecção que a fêmea. 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 (EISTEN, 1999).

A principal forma de transmissão da *Brucella ovis* se dá por via venérea. A transmissão entre os machos foi demonstrada ao saltarem uns sobre os outros, diretamente (mucosa retal), ou indiretamente (mucosa nasal, palpebral e prepúcio), a partir de ejaculações.

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 10 dias após o aborto (GIL TURNES, 1998).

A *B. ovis* penetra nos animais suscetíveis através das mucosas peniana, retal ou vaginal, podendo permanecer nelas por um mês, multiplicando-se lentamente, devido a propriedade de resistir à destruição intrafagocitária. Ao final do segundo mês de infecção produz-se uma bacteremia e o agente localiza-se nos 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 desenvolvimento da infecção difere substancialmente na ovelha em relação ao macho. No macho, células inflamatórias aparecem no sêmen duas a oito semanas depois de infectados e a qualidade do sêmen é deteriorada; lesões palpáveis no epidídimo desenvolvem-se aproximadamente nove semanas pós-infecção (DEFRA, 2001). Na fêmea vazia, *B. ovis* produz vaginocervicite e endometrite, com uma conseqüente infertilidade temporária. Na gestante, *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 e afetados por uma pneumonia supurativa ou com lesões no rim ou fígado, que impedem sua sobrevivência.

Muhammed et al. (1974) relataram que não foi possível o isolamento de *B. ovis* da vagina de ovelhas após 64 dias de infecção, entretanto, observaram persistência no sangue por até 98 dias. A bacteremia foi detectada três semanas seguidas à infecção, de forma transitória ou intermitente. A bactéria pode ser excretada no leite de ovelhas prenhes infectadas (GRILLO et al., 1999).

A existência da brucelose ovina tem sido relatada em outros países da América Latina como Chile, onde observou-se 2,8% de animais positivos (ROJAS et al., 1990a) e Argentina, com 4,3% de positivos (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 Uruguai, Baigun,

Conigliaro e Luna. (2000) observaram que em 12 amostras testadas com teste imunoenzimático (ELISA) e imunodifusão em gel de ágar (ID), dez foram positivas, uma suspeita e uma negativa.

No Brasil, a existência da brucelose ovina foi relatada já há algum tempo, conseqüente à aquisição de animais procedentes dos países nos quais 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), que detectaram por meio da técnica de imunodifusão em gel de ágar (ID), 6,5% de positivos em 3.317 carneiros estudados.

A infecção por *B. ovis* tem sido demonstrada em muitos carneiros jovens, sugerindo que estes animais, logo após a puberdade, poderiam ser altamente suscetíveis ao microorganismo. Os animais adultos são comumente os mais infectados. 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 observada epididimite por *Histophilus ovis* e *Actinobacillus seminis*. Este último agente pode dar reação cruzada com *B. ovis*.

Webb et al. (1980), avaliando os procedimentos para o diagnóstico de *B. ovis* em carneiros infectados artificialmente, relataram a presença de células inflamatórias em amostras de sêmen de dois carneiros, duas semanas pós inoculação e em todos os carneiros, após oito semanas. *B. ovis* foi isolada de sêmen de cinco carneiros quatro semanas após a infecção e em todos os carneiros a partir da quinta semana. Todos os carneiros desenvolveram títulos significantes para a fixação de complemento (FC) entre duas e nove semanas, mas títulos flutuantes foram observados em várias semanas.

Dénes e Glavits (1994), na Hungria, isolaram *B. ovis* de 26 órgãos genitais de 55 carneiros que reagiram sorologicamente aos testes de ID e ELISA. Três dos 26 órgãos eram derivados de carneiros positivos à ID mas

negativos ao ELISA, enquanto que 5 resultaram positivos ao ELISA e negativos à ID; os demais, eram derivados de carneiros sorologicamente positivos em ambas as técnicas.

O diagnóstico sorológico na espécie ovina se aplica, prioritariamente, como um critério de prova em massa, o que explica o fato de no diagnóstico individual a aplicação de vários testes interpretados em conjunto, se constituir uma norma habitual (CASAS OLASCOAGA, 1976). Estes critérios são especialmente válidos nesta espécie, onde as amostras lisas (não causam epididimite nos machos) e as rugosas geram quadros clínicos diferentes. A eleição do método a se utilizar deve incluir boa sensibilidade e especificidade que garantam eficácia (ROJAS et al., 1990b).

Métodos clínicos e bacteriológicos não são adequados para a detecção da doença em um número muito grande de ovinos, pois ambos falham ao detectar todos os animais infectados. Vários métodos sorológicos tem sido usados para detectar anticorpos contra *B. ovis*, incluindo imunodifusão em gel de agar (ID), fixação de complemento (FC), hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta e ELISA (VIGLIOCCO et al., 1997).

A ID baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que se insolubilizam e precipitam no gel, podendo ser visualizados sob a forma de linhas de precipitação; apresenta sensibilidade e especificidade aceitáveis, sendo de fácil execução e interpretação (GIL TURNES, 1998), porém, deve-se ter cuidado com o armazenamento do antígeno utilizado na prova. Nunez-Torres et al. (1998), relataram que o antígeno protéico de extrato salino, utilizado na ID, armazenado a -20°C, apresentou um declínio na sensibilidade de 91%, 61% e 3% após 7, 14 e 21 dias; quando estocado e armazenado a 4°C, a sensibilidade reduziu em 81%, 79% e 0%, respectivamente. A eficácia do gel de agarose decaiu gradualmente durante seis dias depois de preparado. Recomendam que o antígeno de extrato salino seja utilizado por até sete dias depois de reconstituído.

A FC, utilizada isoladamente ou associada com palpação genital e exame bacteriológico do sêmen, tem sido relatada como satisfatória para erradicação da brucelose ovina (HUGHES e CLAXTON, 1968; RIS, 1974).

Entretanto, a FC apresenta a desvantagem de ser complexa já que requer uma rigorosa padronização e titulação dos reagentes (devem ser altamente lábeis), apresenta fenômeno de prozona e tem uma menor sensibilidade e especificidade que o ELISA e a ID, não sendo também compatível com o uso de soros hemolisados (ESTEIN, 1999). Adicionalmente, a inativação do soro pelo calor para uso no teste de FC pode destruir alguns anticorpos (ALTON, 1978). Para Worthington, Stevenson e Lisle (1985), a soropositividade de carneiros infectados negativos à FC é muito alta entre os animais cronicamente infectados. Resultados falso negativos foram observados por Bulgin (1990), o qual relata que de nove carneiros eliminando *B. ovis* no sêmen, seis resultaram negativos à FC e ELISA.

Marin et al. (1989) em carneiros infectados com *B. ovis* examinados pelas técnicas de ID e FC, observaram que alguns animais foram negativos à ID e positivos à FC e vice-versa. Por esta razão, indicam a utilização de ambos os testes para um diagnóstico confirmatório. Ficapal et al. (1998) observaram um aumento de 55,1% na sensibilidade, quando os resultados aos testes de ID e FC eram avaliados juntos. Além destas técnicas, também tem adquirido bastante destaque o ELISA indireto (RAHALEY et al., 1983; CHO e NIILLO 1987, WEST et al., 1993). A prova de ELISA supera em sensibilidade e especificidade as provas citadas anteriormente e permite o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. Adicionalmente, a hemólise e a anticomplementariedade do soro não afetam a reação (EISTEN, 1999).

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

Além dos testes sorológicos, o histórico do rebanho e o quadro clínico do animal, também devem ser levados em consideração ao se interpretar o resultado dos testes sorológicos.

Cho e Niilo (1987) analisando a sensibilidade e a especificidade do ELISA para diagnóstico de *B. ovis*, relataram que o ELISA apresentou 75

resultados positivos e quatro reações suspeitas, enquanto a FC revelou 64 resultados positivos, 13 suspeitos e dois negativos. O ELISA foi considerado o teste mais específico, mais sensível e tecnicamente com mais vantagem que a FC.

Eisten, Baldin e Bowden (2002) utilizaram antígeno HS para prova de ELISA e obtiveram sensibilidade de 96,2%.

Marín et al. (1989) compararam ID, FC e ELISA para *B. ovis* usando diferentes extratos antigênicos, tendo constatado melhor sensibilidade com ELISA (97,6%), seguida da ID (96,4%) e do teste de FC (92,7%), sendo que a ID detectou duas amostras positivas que foram negativas ao ELISA. Todos os testes apresentaram 100% de especificidade, quando se utilizou amostras de soros de carneiros livres de *B. ovis*.

Rojas et al. (1990b), comparando a FC com a ID, com o teste imunoenzimático em papel de nitrocelulose (EIAN), com antígeno celular e EIAN com antígeno fracionado, obtiveram, respectivamente, 44,2%, 100% e 100% de sensibilidade e 100%, 98,5% e 98,1% de especificidade para os testes.

Sensibilidade de 97,1% foi caracterizada na ID realizada com soros de 69 carneiros infectados naturalmente com *B. ovis* e especificidade de 100% foi obtida com 200 amostras de soros de carneiros de propriedades livres de *B. ovis* (ROBLES, 1998).

Através das técnicas de ID e FC, Bermudez et al. (1978), em um estabelecimento de Pelotas-RS, caracterizaram uma positividade de 43,5% em carneiros e de 32,8% em rufiões. Observaram também que essa positividade aumentava com a idade, sendo de 16% em machos dentes de leite e de 71% nos de boca cheia. Magalhães Neto et al. (1991), no Rio Grande do Sul, detectaram 12% de reatores sorológicos à prova de ID e 2,8% positivos ao exame clínico e sorológico.

Ramos et al (1992a), observando 112 carneiros vasectomizados no município de Santana do Livramento, relataram através do teste de ID, 48 reações positivas. No município de Uruguaiana-RS, Ramos et al. (1992b), isolaram *B. ovis* dos epidídimos de 18 (81%) de um total de 22 animais sorologicamente positivos.

Magalhães Neto e Gil Turnes (1996), comprovaram através da ID que, de 1.638 ovinos machos, pertencentes a 76 estabelecimentos criadores, de 20 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, 220 tinham anticorpos contra *B. ovis* e 160 apresentavam manifestações clínicas de epididimite, detectando-se a doença em 46% dos estabelecimentos que utilizavam monta natural e 48% dos que utilizavam inseminação artificial. A soropositividade da infecção foi 12,6% nos carneiros mantidos em condições de campo, 11,7% nos rufiões e 17,7% nos carneiros mantidos em regime de cabanha.

A informação sobre a importância da doença em outros Estados é muito escassa. Marinho e Mathias (1996) testaram soros de ovinos pertencentes a 18 rebanhos de 15 municípios do Estado de São Paulo, mediante as técnicas de imunodifusão, fixação de complemento e teste imunoenzimático indireto, sendo todos negativos. A FC e a ID revelaram boa especificidade, mas o ELISA indireto apresentou resultados falso-positivos.

O emprego de agentes redutores de ponte de enxofre como o 2-mercaptoetanol (2-ME), vem sendo utilizado rotineiramente no diagnóstico de brucelose bovina. O 2-ME degrada a configuração da imunoglobulina M (IgM), impedindo-a de exercer sua atividade aglutinante, enquanto a classe de imunoglobulina G (IgG) não sofre qualquer alteração em presença desta substância. A prova de 2-ME é útil para detectar infectados crônicos (humanos e animais). Nos animais infectados, os anticorpos IgG (ME-resistentes), persistem por mais tempo e alcançam títulos mais altos que os anticorpos IgM (ME-suscetíveis) (CASAS OLASCOAGA, 1976), no entanto, animais que estejam em início de infecção, onde há predomínio de IgM, não podem ser detectados (NIELSEN e DUNCAM, 1990).

O tratamento dos soros com solução de 2-mercaptoetanol (2-ME) tem como função inibir as reações inespecíficas decorrentes de IgM, melhorando a especificidade da prova, sem perda de sensibilidade, sendo indicado no diagnóstico de soroaglutinação rápida (SAR) em cartão para brucelose canina (CARMICHAEL, 1969). Os anticorpos IgM, com configuração de pentâmero, degradam-se em cinco unidades semelhantes, pela redução da cadeia dissulfito

(devido a compostos que contém radical tiol como o 2-ME). Estas subunidades perdem a atividade de anticorpos plurivalente e se comportam como anticorpos univalentes. Quando combinam-se com o antígeno, não originam complexos suficientemente grandes para precipitar (o que acontece na ID) ou aglutinar (como na SAR) (ANDERSON et al, 1964).

Moraes (2000), estudando a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães da microrregião da serra de Botucatu, observou 202 (18,84) animais reagentes ao teste de ID, porém quando estes soros foram submetidos ao tratamento com 2-ME apenas nove (0,84%), resultaram também, reagentes ao teste. Resultados discrepantes também foram observados por Keid (2001), pesquisando *B. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e de canis comerciais, observou que 43 (44,79%) amostras positivas ao teste de ID s/ 2-ME, 6 resultaram positivas e 37 negativas à ID c/ 2-ME; 12 positivas e 31 negativas à hemocultura e 11 positivas e 32 negativas ao PCR. Dentre as seis amostras positivas na ID c/ 2-ME, cinco resultaram positivas e uma negativa à hemocultura. Das 16 amostras positivas na PCR a ID c/ 2-ME diagnosticou cinco positivos e de 80 (83,33%) animais negativos na PCR, a ID c/2-ME diagnosticou um positivo. O autor concluiu que, em relação à hemocultura, a ID s/ 2-ME apresentou alta sensibilidade e baixa especificidade, já a ID c/ 2-ME apresentou alta especificidade e baixa sensibilidade, sendo os resultados positivos aceitos como confirmatórios, porém, nos negativos, persistindo a suspeita de infecção.

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.

As infecções causadas por *B. ovis* estão amplamente disseminadas no Rio Grande do Sul e nos países dos quais se importam reprodutores. Mesmo não havendo informação sobre a prevalência da doença em outros estados brasileiros, como o Rio Grande do Sul um estado importador e exportador de reprodutores, deve ser exigida a realização de testes de brucelose ovina. Estas comprovações salientam a importância do estabelecimento de rotinas de detecção da doença nos reprodutores comercializados no Estado (GIL TURNES, 1998). 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 a aplicação de duas ou mais técnicas para um resultado conclusivo, o que às vezes pode ser muito oneroso e demorado.

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 a 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, ID, ELISA) e/ou bacteriológico de sêmen. A ID, 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).

O Estado de São Paulo possui 43 cabanhas que registram seus animais na Associação. Esta produção vem se desenvolvendo bastante nos últimos anos, com o conseqüente surgimento de várias outras cabanhas que compram animais deste Estado e principalmente do Rio Grande do Sul. Tem-se verificado a ocorrência de animais positivos ao teste de imunodifusão em gel de ágar em soros de ovinos encaminhados para diagnóstico, porém desconhece-se a situação atual desta doença em tal região e a correlação destes achados com a clínica dos animais (ASPACO - Associação Paulista dos Criadores de Ovinos).

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a frequência de reações sorológicas para *B. ovis*, em ovinos de cabanhas da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, que registram seus animais na ASPACO.

2.2. Específico

- Avaliar a soropositividade da enfermidade nas cabanhas do Estado.
- Comparar os resultados de ID com e sem 2-ME com ELISA
- Correlacionar os resultados positivos na ID com e sem 2- ME com o quadro clínico dos animais.
- Correlacionar os resultados positivos no ELISA com o quadro clínico dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – MATERIAL

3.1.1. Animais

Foram colhidas, no total, 1033 amostras de soro sanguíneo de ovinos, tanto machos como fêmeas, em 11 cabanhas visitadas, conforme representa o quadro 1.

Quadro 1 - Número de amostras colhidas e de propriedades visitadas, segundo o município da região centro-oeste do estado de São Paulo.

Município	População total de animais	Total de amostras colhidas	Nº propriedades visitadas
Jaú	300	113	2
Avaré	517	171	2
Bauru	200	84	1
Botucatu	2039	665	6
Total	3056	1033	11

3.1.2. Antígenos

3.1.2.1. Para a prova de Soroaglutinação Rápida em Placa com Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT), corado pelo Rosa Bengala, utilizou-se antígeno produzido pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), constituído por suspensão celular inativada de *B. abortus*, na concentração de 8% pH 3,65, corado com rosa bengala.

3.1.2.2. Antígeno para a Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (ID): utilizou-se antígeno HS de *Brucella ovis* produzido pelo TECPAR*.

* Gentilmente cedido por Jorge Bacilla do Instituto de Tecnologia do Paraná.

3.2. - TÉCNICAS

3.2.1. Soroaglutinação Rápida em Placa com Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT), corado pelo Rosa Bengala, com base em Mac Millan (1990).

O soro e o antígeno permaneceram por 30 minutos em temperatura ambiente, antes da realização da prova. As reações foram realizadas em placas de vidro quadriculada, depositando-se 30 µL do soro a ser testado e, em seguida, depositando-se ao lado, 30 µL do antígeno.

A homogeneização do soro e antígeno foi realizado com bastão de vidro, formando círculos de 2 cm de diâmetro. Durante 4 minutos, foram realizados movimentos circulares na placa, à razão de 10 a 20 movimentos por minuto, sendo a leitura realizada ao final deste período.

Os resultados foram interpretados a partir de reações de aglutinação, indicada pela presença de grumos nas amostras positivas e ausência nas negativas.

3.2.2. Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (ID s/ 2-ME) [(protocolo utilizado de acordo com as recomendações do Instituto Tecnológico do Paraná – TECPAR)].

Preparou-se o gel e o tampão borato, conforme ANEXO 1. Após a completa dissolução pelo calor, foram distribuídos 15 mL do gel em placas de petri descartáveis de 90 x 15 mm de diâmetro, sem ranhuras no fundo, permanecendo em temperatura ambiente até sua solidificação e armazenados a 2-8°C por, no mínimo, 30 minutos e, no máximo, 24 horas. No momento do uso, o gel foi perfurado com moldes de 6 mm de diâmetro e 2,5 mm de distância entre as bordas, formando um poço central e os outros seis distribuídos em torno deste, tendo cada poço capacidade de 35 µL de material. Após a retirada do ágar, os poços foram imediatamente preenchidos com soros positivos, soros a testar e antígeno.

Os soros reagentes positivos (soro padrão), foram depositados nos orifícios superiores e inferiores ao orifício central, no qual foi depositado o

antígeno. Os soros a testar, foram depositados nos quatro orifícios laterais do molde. As placas foram mantidas em câmara úmida, em temperatura de 25°C.

As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas, utilizando sistema de iluminação com luz indireta e fundo preto. O resultado final foi obtido ao final de 72 horas, considerando-se como positivo soros pertencentes aos orifícios que apresentaram a formação de linhas de precipitação que se uniam em um ângulo de 90° às linhas do soro controle positivo e negativo onde não houve formação de linhas. Reação suspeita foi considerada quando se observava uma linha com tendência de precipitação dentro do orifício.

3.2.3. Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar modificada (ID c/ 2-ME)

Os soros foram tratados com 2-ME (LISLE e CARMICHAEL, 1974). Todos os soros foram submetidos ao tratamento com 0,2 M de 2-mercaptoetanol (1,41 mL de 2-mercaptoetanol para 100 mL de água destilada). Dessa forma, à quantidade de 100 µL de soro foi adicionada 100 µL da solução de 2-ME 0,2 M, permanecendo em reação durante 30 minutos, após o qual 35 µL dos soros tratados foram submetidos à ID e interpretados de forma idêntica à descrita no item anterior.

3.2.4. Teste de ELISA

Uma vez que o ELISA é o teste preconizado pela OIE como alternativa para a FC (OIE, 2003), foi considerado neste estudo como “teste padrão”.

O teste de ELISA foi realizado utilizando CHEKIT- *Brucella ovis* test (Bommeli Diagnostics)*, de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante da seguinte maneira:

Foram depositados nos poços 200 µL das amostras a testar e controles pré-diluídos a 1:200 e incubados por 90 minutos a temperatura de 18-25 °C, em câmara úmida.

* Gentilmente cedido pelo Laboratório Intervet de Boxmeer - Netherlands.

Após a incubação foram realizadas duas lavagens da placa e foi adicionado 200 µL do conjugado pré-diluído a 1:200, sendo novamente incubado por 60 minutos à temperatura de 18-25 °C, em câmara úmida.

Após a realização de duas novas lavagens, foi adicionado 200 µL de cromógeno em cada poço. Após 15-30 minutos, a reação foi interrompida por adição de 50 µL de solução stop em cada poço da placa. A leitura foi realizada em leitor de ELISA Multiskan, utilizando comprimento de onda de 405 nm.

Os cálculos para positividade e negatividade basearam-se na fórmula: **Valor (%) = $(DO_{amostra} - DO_{negativo} / DO_{positivo} - DO_{negativo}) \times 100\%$** , onde DO = densidade óptica. A fórmula e interpretação dos resultados foram baseados no preconizado pelo laboratório produtor, sendo que para valores < 10%, a amostra foi considerada negativa, valores entre 10-50%, a amostra foi classificada como suspeita e > 50%, a amostra era caracterizada como positiva.

Em todos os testes foram utilizados soros sabidamente positivos e negativos como controles de reação.

3.3. - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. Amostragem

O tamanho da amostra foi obtido a partir de um intervalo de confiança de 95% com um erro esperado de 10%. Foram definidos para estudo os municípios da região centro-oeste que possuíam cabanhas cadastradas na ASPACO, envolvendo, desta forma, os municípios de Botucatu, Jaú, Bauru e Avaré. Os animais foram escolhidos aleatoriamente para um resultado mais diversificado.

3.3.2. Colheita do material

A colheita do material foi realizada após assepsia local, com álcool iodado. O sangue foi colhido através de venopunção jugular, utilizando-se sistema a vácuo estéril sem anticoagulante (Vacuttainer), com agulha 21G, retirando-se,

aproximadamente, 10 mL de sangue por animal. Esse material foi mantido em posição de descanso por, no máximo, 24 horas, para a formação do coágulo, visando a obtenção do soro.

3.3.3. Obtenção e armazenamento do soro

Após a retração do coágulo e liberação do soro, as amostras foram identificadas, aliquotadas em tubos tipo eppendorf® e conservadas em freezer (-20°C), até a realização das provas sorológicas.

3.3.4. Provas sorológicas

Todas as amostras colhidas foram submetidas à prova de soroaglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado corado por Rosa Bengala (TAAT), para o descarte de uma possível infecção por *B. abortus*. Em todos os soros foram realizadas as provas de ID em gel de ágar sem 2-ME, ID com 2-ME e ELISA.

As provas foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada às Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ - UNESP/Botucatu, São Paulo.

3.4 - INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

Foi aplicado um questionário epidemiológico em todas as propriedades avaliadas, incluindo informações relativas à idade e procedência dos animais, aquisição de novos animais, conhecimento sobre a doença, observação de abortos, nascimentos de crias fracas ou alterações escrotais, uso de quarentena no rebanho e frequência de realização de exames sorológicos (Anexo 2).

3.5 – EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

Todos os machos foram submetidos a palpação dos testículos e epidídimo, observando-se o tamanho e consistência do órgão.

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DO DADOS

Para análise dos resultados os animais foram classificados em positivos, suspeitos e negativos em todos os testes, sendo avaliada a associação entre os resultados das provas, considerando-se os limites de 95% de confiança para a proporção binomial de concordância, cujos valores foram expressos em porcentagem (Norman e Streiner, 1994).

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 – Resultados obtidos na prova de Soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT).

Todos os 1033 soros submetidos à prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado, resultaram negativos ao teste.

Os resultados entre os diferentes métodos diagnósticos para a *Brucella ovis* estão demonstrados nas tabelas 1 a 7.

4.2 - Resultados obtidos nos testes de ID s/ 2-ME, ID c/ 2-ME e ELISA

Tabela 1 – Ovinos submetidos à prova de Imunodifusão em Gel de Ágar sem 2-mercaptoetanol (ID s/ 2-ME), aplicado ao diagnóstico de brucelose por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003.

MUNICÍPIO	ID s/ 2-ME		
	POS (%)	NEG(%)	SUSP(%)
JAÚ	10 (8,8)	99 (87,6)	04 (3,5)
AVARÉ	09 (5,3)	158 (92,4)	04 (2,3)
BAURU	07 (8,3)	75 (89,3)	02 (2,4)
BOTUCATU	98 (14,7)	539 (81,0)	28 (4,2)
TOTAL	124 (12,0)	871 (84,3)	38 (3,7)

Das 1033 amostras testadas, 871 (84,3%) não apresentaram a formação de linhas de precipitação ao teste de ID s/ 2-ME, em 124 (12,0%) ocorreu a formação de linhas de precipitação com identidade e em 38 (3,7%), houve a formação de linhas de reação fraco positiva (suspeitas).

Tabela 2 - Ovinos submetidos à prova de Imunodifusão em Gel de Ágar com 2-mercaptoetanol (ID c/ 2-ME), aplicado ao diagnóstico de brucelose por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003.

MUNICÍPIO	ID c/ 2-ME		
	POS (%)	NEG(%)	SUSP(%)
JAÚ	0 (0,0)	113 (100)	0 (0,0)
AVARÉ	0 (0,0)	171 (100)	0 (0,0)
BAURU	0 (0,0)	84 (100)	0 (0,0)
BOTUCATU	11 (1,7)	651 (97,9)	3 (0,4)
TOTAL	11 (1,1)	1019 (98,6)	3 (0,3)

Das 1033 amostras testadas, 1019 (98,6%) não apresentaram a formação de linhas de precipitação ao teste de ID c/ 2-ME, em 11 (1,1%) ocorreu a formação de linhas de precipitação com identidade do soro e em três (0,3%), houve a formação de linhas de reação fraco positiva (suspeitas).

Tabela 3 – Ovinos submetidos ao teste de ELISA, aplicado ao diagnóstico de brucelose por *B. ovis*, segundo o município de origem e a natureza dos resultados. Botucatu, 2003.

MUNICÍPIO	ELISA		
	POS (%)	NEG(%)	SUSP(%)
JAÚ	0 (0,0)	105 (93,0)	8 (7,0)
AVARÉ	0 (0,0)	166 (97,0)	5 (3,0)
BAURU	0 (0,0)	76 (90,4)	8 (9,6)
BOTUCATU	0 (0,0)	625 (93,9)	40 (6,1)
TOTAL	0 (0,0)	972 (94,0)	61 (6,0)

Das 1033 amostras testadas, 972 (94,0%) não apresentaram nenhuma reação ao teste de ELISA, sendo consideradas negativas; em 61 (6,0%) ocorreram reações, consideradas fracas, segundo interpretação sugerida pelo fabricante, sendo estas amostras classificadas como suspeitas ao teste. Não houve nenhum resultado positivo ao teste, no entanto, em todos os municípios foram observados animais suspeitos ao teste.

4.3 – Resultados comparativos dos testes utilizados

Tabela 4 – Resultados comparativos obtidos na prova de Imunodifusão sem 2-mercaptoetanol (ID s/ 2-ME) frente à Imunodifusão com 2-mercaptoetanol (ID c/ 2-ME), em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003.

ID c/ 2-ME	ID s/ 2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	11	0	0	11
NEG	110	871	38	1019
SUS	3	0	0	3
TOTAL	124	871	38	1033

Dentre as amostras positivas ao teste de ID s/ 2-ME somente 11 resultaram igualmente positivas e três suspeitas, sendo as demais consideradas negativas ao teste de ID c/ 2-ME. Todas as amostras negativas a ID s/ 2-ME resultaram igualmente negativas na ID c/ 2-ME, enquanto que as suspeitas na ID s/ 2-ME resultaram negativas na ID c/ 2-ME.

Tabela 5 – Resultados comparativos obtidos na prova de Imunodifusão sem 2-mercaptoetanol (ID s/ 2-ME) frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003.

ELISA	ID s/ 2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	0	0	0	0
NEG	117	820	35	972
SUS	7	51	3	61
TOTAL	124	871	38	1033

Dentre as amostras positivas na ID s/ 2-ME, 117 foram negativas e sete suspeitas ao teste de ELISA. Das amostras suspeitas à ID s/ 2-ME, 35 foram negativas e três suspeitas ao teste de ELISA. Dentre as amostras negativas na ID s/ 2-ME, 820 foram igualmente negativas e 51 foram suspeitas ao teste de ELISA.

Tabela 6 – Resultados comparativos obtidos na Imunodifusão com 2-mercaptoetanol (ID c/ 2-ME) frente ao ELISA, em soros ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu - SP, 2001-2003. Total de amostras.

ELISA	ID c/ 2-ME			Total de amostras
	POS	NEG	SUSP	
POS	0	0	0	0
NEG	11	958	3	972
SUS	0	61	0	61
TOTAL	11	1019	3	1033

Dentre as amostras que resultaram positivas ao teste de ID c/ 2-ME todas resultaram negativas ao teste de ELISA. Das amostras suspeitas na ID c/ 2-ME, três foram negativas ao teste de ELISA. Dentre as amostras negativas ao teste de ID c/ 2-ME, 958 foram também negativas enquanto que e 61 resultaram suspeitas ao teste de ELISA.

4.4 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada comparando-se os testes quanto ao nível de concordância entre eles.

Tabela 7 - Limites de concordância entre as provas utilizadas, considerando-se o total de amostras de soros de ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo, Botucatu - SP, 2001-2003.

TESTES	LIMITES DE CONCORDÂNCIA (%)	
	INFERIOR	SUPERIOR
ID s/ 2-ME x ID c/ 2-ME	83,23	87,54
ID s/ 2-ME x ELISA	77,22	82,13
ID c/ 2-ME x ELISA	91,16	94,32

ID s/ 2-ME= imunodifusão sem 2-mercaptoetanol

ID c/ 2-ME= imunodifusão com 2-mercaptoetanol

Pela associação entre as respostas das provas analisadas observou-se melhor concordância (variação de 91,16% à 94,32%) entre as provas de ID c/ 2-ME e ELISA. Moderada concordância (variação de 83,23% à 87,54%) foi observada entre as provas de ID s/ 2-ME e ID c/ 2-ME, seguida de uma baixa concordância (variação de 77,22% à 82,13%) entre as provas de ID s/ 2-ME e ELISA.

4.5 – Resultados do inquérito epidemiológico

a) Aquisição dos animais e uso de quarentena

Das 11 propriedades analisadas, em 72,7% os criadores adquiriram animais de propriedades vizinhas, enquanto 27,3% adquiriram animais providos da região Sul. Destas propriedades em apenas 45% se faziam o isolamento dos animais, quando adquiridos, por aproximadamente uma semana, enquanto que em 55%, introduziam-se os animais junto ao rebanho, imediatamente após a aquisição.

b) Conhecimento da doença

Dentre as propriedades estudadas, 54,5% dos produtores possuíam algum conhecimento sobre a brucelose ovina e o seus danos ao rebanho ou, pelo menos, já haviam ouvido a respeito, enquanto 45,5% não tinham informação sobre a doença ou achavam que se tratava do mesmo agente da brucelose bovina.

c) Quadro clínico dos animais: histórico de aborto ou epididimite

Dos proprietários, 55% relataram histórico de abortamento ou nascimento de crias fracas e 45% nunca foi observado qualquer caso de aborto. De todas as propriedades, nenhuma apresentou histórico de animais com epididimite.

Dos animais reagentes (considerados positivos e/ou suspeitos), que pertenciam às propriedades com histórico de abortamento, 53,7% (87/162) foram reagentes à prova de ID s/ 2-ME, 85,7% (12/14) à prova de ID c/ 2-ME e 67,2% (41/61) ao teste de ELISA. Dos animais reagentes (considerados positivos e/ou suspeitos), que pertenciam às propriedades que não tinham histórico de abortamento, 46,3% (75/162) foram reagentes à prova de ID s/ 2-ME, 14,3% (2/14) à prova de ID c/ 2-ME e 32,8% (20/61) ao teste de ELISA. Os resultados podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos (total de amostras), quanto ao número de animais reagentes às provas sorológicas aplicadas no estudo, frente ao número de propriedades com histórico de abortamento e/ou nascimento de crias fracas, em ovinos procedentes de cabanhas da região centro-oeste do Estado de São Paulo, Nos anos de 2001-2003.

Número de Propriedades	ID s/ 2-ME	ID c/ 2-ME	ELISA
Com histórico	87 (53,7%)	12 (85,7%)	41 (67,2%)
Sem histórico	75 (46,3%)	2 (14,3%)	20 (32,8%)
TOTAL	162 (15,7%)	14 (1,3%)	61 (6,0%)

d) Realização de testes sorológicos

Das 11 propriedades apenas em uma realizava-se exames periódicos para diagnóstico da brucelose ovina, cinco delas realizavam exames sorológicos somente na aquisição dos animais ou para participação em exposições.

e) Faixa etária dos animais

Dentre os animais reagentes ao teste de ID s/2-ME, tanto positivos como suspeitos, 73% se encontravam na faixa etária de dois a quatro anos, 20% possuíam menos de dois anos de idade e 7% mais que quatro anos.

Quando avaliados frente ao teste de ID c/2-ME, nove (64,3%) dos 14 animais considerados suspeitos e/ou positivos, pertenciam a faixa etária de dois a quatro anos e cinco (35,7%) possuíam menos de dois anos de idade.

Ao teste de ELISA, 52 (85,2%) dos animais considerados suspeitos pertenciam a faixa etária de dois a quatro anos de idade, enquanto oito (13,1%) inferiores a dois anos e um superior a quatro anos de idade.

4.5 – Resultado do exame clínico dos animais

Todos os animais avaliados apresentaram-se normais quando submetidos ao exame clínico. À palpação escrotal, nenhum animal apresentou alterações quando avaliados.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Neste estudo não se observou nenhum animal reagente à prova de TAAT. Resultados concordantes foram observados por Marinho e Mathias (1996), em ovinos do estado de São Paulo. Já Viegas et al (1980), no estado da Bahia, utilizando a prova de soroaglutinação rápida, observaram um percentual de 3% de positividade para *B. abortus*, em 162 ovinos avaliados.

Observou-se neste estudo, 12% de positividade ao teste de ID s/ 2-ME, resultado discordante quando comparado ao elevado percentual observado por Bermudez et al. (1978), no RS, que relataram 43,5% de positividade em carneiros e 32,8% em rufiões, e por Silva et al (2001), os quais analisando 30 rebanhos em 13 municípios do Rio Grande do Norte, obtiveram um percentual de 34% de animais positivos à ID.

Resultados semelhantes aos deste estudo foram observados por Magalhães Neto et al. (1991), os quais ao examinarem 822 carneiros de 54 rebanhos do RS, obtiveram 12% reagentes ao teste de ID. Positividade similar foi observada por Magalhães Neto e Gil Turnes (1996), que encontraram, no Rio Grande do Sul, 13,4% de positividade em 1638 carneiros examinados, utilizando antígeno produzido pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CPZ).

Os resultados deste experimento são também semelhantes aos relatados por Ramos et al. (1992c), em Santana do Livramento, os quais avaliando 1.483 soros de carneiros, encontraram um percentual de 16,92% de positivos sorologicamente ao teste de ID, utilizando antígeno HS REO 198, produzido pelo Instituto de Pesquisa Desidério Finamor.

Contrariamente, Marinho e Mathias (1996), ao avaliarem 850 soros de ovinos do estado de São Paulo, não observaram nenhum animal reagente à ID. Esta diferença pode ser decorrente da diferença no antígeno, uma vez que os autores utilizaram uma amostra 63/290 de *B. ovis*.

Os resultados deste estudo também diferem dos encontrados em outros países. Robles et al. (1993), na Argentina, constatarem 15 (4,3%) animais positivos, em 345 carneiros estudados e em 1998, os mesmos autores (ROBLES et al., 1998), observaram 2,1% de positividade no primeiro ano de estudo de um

rebanho Corriedale na Argentina, tendo sido observado, no terceiro ano, um aumento do percentual para 6,3%. Contrariamente também, no Chile, Rojas et al. (1990b), utilizando as técnicas de ID, FC e ELISA em papel de nitrocelulose, registraram um percentual de 2,8, 7,8 e 8,3%, respectivamente.

Observou-se uma discrepância nos resultados quando os soros foram submetidos ao tratamento com 2-ME. O percentual de positividade dos soros, após o tratamento, resultou em 1,1%. No Brasil não se tem informação sobre estudos de ID de soros ovinos tratados com 2-ME, porém, MORAES (2000) também observou uma diminuição na positividade de soros reagentes ao teste de ID quando submetidos ao tratamento com 2-ME. Resultados similares foram observados por KEID (2001) e justificados por possíveis reações inespecíficas, pois os LPS de várias bactérias gram negativas podem apresentar reação cruzada com *B. canis*, o mesmo podendo ocorrer para *B. ovis*.

Neste estudo, utilizou-se Ag produzido de referência nacional e comercializado nacionalmente para o diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis*, comparativamente a um kit diagnóstico de ELISA produzido em outro país, porém constituído pelo mesmo Ag utilizado no kit nacional. A discrepância dos resultados obtidos reafirma a variação de resultado dependente da origem do Ag, corroborando o citado por Koerich e Vaz (2002).

A maioria dos antígenos produzidos comercialmente para o uso na ID, são antígenos de parede celular, que tem como desvantagem o fato de dar reações cruzadas com outras bactérias. O uso de ID com antígeno citoplasmático seria um método mais específico, já que este teste detecta, no caso de cães, antígenos a partir de 12 semanas pós infecção, até 36 meses após o período de bacteremia, o que permite a utilização para detecção de infecções crônicas, quando outros testes fornecem resultados negativos (CARMICHAEL, 1990).

Quanto ao teste de ELISA, não houve animais reagentes que pudessem ser considerados positivos ao teste, embora 6% deles tenham apresentado densidade óptica considerada como animais suspeitos. Marinho e Mathias (1996), relataram ter encontrado reações falso positivas ao teste de ELISA. Este, no entanto, é considerado como teste alternativo à FC e preconizado

pelo Office International des Epizootie (OIE, 2003) para o diagnóstico da brucelose ovina.

Quando analisados os resultados das provas de ID s/ 2-ME com ID c/ 2-ME, 11/124 animais foram positivos em ambas as provas, porém, 110 dos positivos na ID s/ 2-ME foram classificados como negativos na ID c/ 2-ME. Isto poderia ser atribuído à ação do 2-ME, responsável por degradar as moléculas de IgM. Por outro lado, poderia também ser decorrente de menor sensibilidade da ID c/ 2-ME (KEID, 2001). A redução da sensibilidade pode ser decorrente da diluição do soro quando tratado com 2-ME. Embora Carmichael (1990), considere que o tratamento com 2-ME não altere a sensibilidade da técnica de aglutinação, não se pode aferir o mesmo com relação a ID, uma vez que o limiar de detecção deste método é três vezes superior ao da aglutinação, detectando um mínimo de 30 gramas de anticorpos/mL, frente à aglutinação que detecta 10,05 grama/mL (MATUKUMA e RICHTZENHAIN, 1997).

Dos resultados da ID s/ 2-ME comparados com os do ELISA, observou-se que o ELISA detectou sete animais que resultaram positivos e suspeitos à ID s/ 2-ME. Porém, 51 dos negativos na ID s/ 2-ME foram suspeitos ao teste de ELISA, aspecto que poderia ser explicado pela elevada sensibilidade do teste. Os resultados são corroborados por Krt (1993), que avaliando os mais importantes métodos sorológicos para diagnóstico de brucelose ovina, observou resultados positivos em 77 (7,5%) ao teste de FC a frio e 50 (4,9%) à FC a quente. Ao teste de ID, 89 (7,7%) e ao ELISA 303 (29,6%), 193 (18,9%) e 118 (11,5%), quando considerados absorvência de 2, 2,5 e 3, respectivamente. O ELISA é um método bastante sensível, mas algumas vezes não é específico, devido a reações cruzadas com outros anticorpos.

Comparando-se o ELISA com a ID c/ 2-ME, notou-se que esta não detectou nenhum dos soros dos animais reagentes ao teste de ELISA.

No presente estudo, os menores resultados concordantes, estatisticamente, foram observados entre as provas de ID s/ 2-ME e ELISA (77,22%-82,13%). Percentual similar foi também observado por Cerri et al. (2000) que, estudando os testes empregados no diagnóstico sorológico de

brucelose causada por *B.ovis*, obtiveram um índice de 77,74% de concordância entre as provas de ID e ELISA.

Quando comparada as provas de ID s/ 2-ME e ID c/ 2-ME e ID c/ 2-ME e ELISA, observou-se uma variação de 83,23 à 87,54% e 91,16 à 94,32%, respectivamente, de resultados concordantes, demonstrando elevado índice de concordância da ID c/ 2-ME com a técnica de ELISA, considerada de alta sensibilidade e especificidade, mas que, apesar destas características, tem seu uso restringido pelo alto custo.

Embora tenha apresentado melhor resultado estatístico, a ID c/ 2-ME não foi capaz de detectar os animais reagentes ao teste de ELISA. Uma vez que as reações no ELISA foram somente suspeitas, não se pode afirmar que os animais sejam positivos, porém se considerarmos a recomendação da OIE (2000), da utilização de ELISA e ID para melhorar a sensibilidade dos testes, os melhores resultados, porém, não estatísticos, foram observados com a ID s/ 2-ME e ELISA. Resultados positivos na ID s/ 2-ME e suspeitos no ELISA ou mesmo suspeitos em ambos os testes, sugerem no mínimo a necessidade de reteste dos animais ou utilização de técnicas mais específicas e sensíveis, aspecto já citado por Mac Millan (1990).

O ELISA apresenta maior sensibilidade que a ID ou FC, porém, em função de alguns resultados ELISA negativos e ID positivos, a combinação da ID com ELISA resultaria em sensibilidade ótima (OIE, 2000). Desta forma, a associação da ID s/ 2-ME ao ELISA, apresentou melhores resultados, detectando sete animais positivos e três suspeitos ao ELISA, contrariamente à ID c/ 2-ME que não apresentou concordância de resultados positivos, comparativamente ao ELISA. Estes resultados são reforçados pela recomendação da OIE (2000) da utilização da associação da ID com ELISA, para aumentar a sensibilidade do teste.

Em relação às propriedades analisadas, observou-se que em 72,7% foram adquiridos animais de propriedades vizinhas, sendo que somente em 45% se faziam isolamento dos animais comprados.

Os animais reagentes, tanto positivos como suspeitos a todos os testes aplicados neste estudo, pertenciam a faixa etária dos dois a quatro anos, na qual os animais são mais susceptíveis à infecção por *B. ovis*. Estes dados discordam de Bermudez et al. (1978), que relataram um aumento na positividade conforme o aumento da idade. Os autores observaram um percentual de 16% em machos dentes de leite e 71% nos de boca cheia. No presente estudo, o menor percentual de animais reagentes pertenciam à faixa dos animais maiores de quatro anos. Dados semelhantes foram observados por Ficapal et al. (1998), relatando que tanto os animais mais jovens (< dois anos) quanto os mais velhos (> cinco anos), eram os menos infectados por *B. ovis*.

Embora a maioria (55%) dos criadores tenham relatado histórico de abortamento ou nascimento de crias fracas, somente alguns (5), realizavam exames na aquisição de novos animais, apesar de grande parte dos proprietários possuírem moderado conhecimento sobre a doença. O fato de apenas alguns proprietários tomarem medidas de precaução na aquisição de novos animais, propicia a disseminação não só da brucelose ovina, já que alguns adquiriam animais do Sul do país onde a doença tem elevada prevalência, como também de outros tipos de doenças.

Neste estudo, a melhor correlação entre animais reagentes aos testes sorológicos e histórico de abortamento nas propriedades, foi observado na prova de ID c/ 2-ME, contudo, não se pode atribuir esta correlação como positiva aos dados encontrados no estudo, devido a inconstância do rebanho, onde a compra e venda dos animais são frequentes.

O fato da brucelose ovina não ser considerada doença de controle obrigatório pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, ressalta a importância na profilaxia das cabanhas do estado de São Paulo, já que a ovinocultura vem se desenvolvendo bastante nos últimos anos.

As discrepância de resultados observados nas técnicas sorológicas, associadas à ausência de sintomatologia clínica nos animais

impossibilita a caracterização da doença de forma eficiente e demonstra a necessidade de desenvolvimento e aprimoramento de recursos diagnósticos.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- 1) Não foi possível definir de forma conclusiva, o percentual de ocorrência da brucelose ovina nas cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo.
- 2) A associação dos testes de ELISA e ID, sugerem um percentual de 0,97% (10/1033), de positivos nas cabanhas.
- 3) A ID c/ 2-ME não foi capaz de detectar os animais reagentes ao teste de ELISA.
- 4) A ID s/ 2-ME apresentou percentual de positividade elevado, não concordantes com o teste de ELISA e com a ID c/ 2-ME.
- 5) A ID s/ 2-ME detectou animais suspeitos no ELISA.
- 6) As reações positivas e suspeitas observadas, não apresentaram associação com sintomatologia clínica dos animais.
- 7) A aplicação associada da ID s/ 2-ME ao ELISA deve ser incentivada para o diagnóstico da brucelose ovina, por possibilitar resultados mais confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. K. et al. Brucella agglutinating antibodies: Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. **Science**, Washington, v.143, p.1334-1335, 1964.

ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Aust. Vet. J.**, v.54, p. 551-557, 1978.

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.

BERMÚDEZ, J. et al. Controle da brucelose ovina em um estabelecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16., 1978, Salvador. **Anais...**Salvador, 1978. p.23.

BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.351-378.

BLASCO, J. M.; BARBERÁN, M. *Brucella ovis*: epidemiologia, patogenia y cuadro clínico. [*Brucella ovis*: epidemiology, pathogenesis and pathology]. **Ovis (Trattado de Patologia y Producción ovina)**, v.8, p.25-32, 1990.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Divisão de Defesa Sanitária Animal. Departamento Nacional de Produção Animal. **Instrução de Serviço N° 07/78**. Brasília, 1978.

BULGIN, M. S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.196, n.2, p.313-315, 1990.

BURGESS, G. W. Ovine contagious epididymitis: a review. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.7, p.551-575, 1982.

CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. **Proc. Annu. Meet. U.S. Livest. Sanit. Assoc.**, Memphis, v.71, p.517-527, 1969.

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal brucellosis**. Boston: CRC Press, 1990. p.335-350.

CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. **Centro Panam. Zoo.**, Buenos Aires, v.18, p.107-141, 1976.

CERRI, D. et al. Evaluation of tests employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. **New Microbiol.**, Pavia, v.23, n.3, p.281-288, jul. 2000.

CHO, H.J.; NILO, I. Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v.51, p.99-103, 1987.

CORBEL, M. J. Recent advances in the study of brucella antigens and their serological cross-reactions. **Vet. Bull.**, Farnham Royal, v.55, n.12, p.927-942, dec. 1985.

DEFRA. Diseases surveillance and control. **Contagious epididymitis**, London. 2001. Disponível em:
<<http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/diseases/epididymitis.htm>>. Acesso em: 24 set. 2002.

DÉNES, B.; GLÁVITS, R. Bacteriologically confirmed cases of ovine epididymo-orchitis caused by *Brucella ovis* in Sub-Carpathia. **Acta Vet. Hung.**, Budapest, v.42, n.1, p.25-33, 1994.

DRAGHI-DE-BENITEZ, M. G. et al. Serological survey for ovine brucellosis in 6 districts of Corrientes Province, Argentina. **Vet. Argent.**, Buenos Aires, v.1, n.1, p.39-43, 1984.

EISTEN, S. M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epidemitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v.31, n.1, 1999.

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.**, Columbia, v.14, n.5, p. 407-411, sep. 2002.

FERNANDES, J. C. T. et al. Levantamento sorológico parcial da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1966-67, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: SOVERGS, 1966-67, p.16.

FERNANDES, J. C. T.; LOUZADA, C. A. R. Controle da epididimite ovina pelo manejo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1969, Rio grande do Sul. **Anais...**Rio Grande do Sul: SOVERGS, 1969, p.37-40.

FICAPAL, A. et al. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v.29, p. 13-19, 1998.

GIL TURNES, C. Brucelose ovina. In: CORREA, R. F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. **Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 1998. p.161-169.

GRILLO, M. J. et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. **Vet. Rec.**, London, v.144, n.20, p.555-558, 1999.

HAJKTÓS, I. et al. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. **J. Vet. Med.**, Berlin, v.34, p.138-147, 1987.

HILBINK, F. et al. 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.**, Wellington, v.41, p.111-115, 1993.

HUGHES, K. L.; CLAXTON, P. D. *Brucella ovis* infection. Na evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v.44, p.41-47, 1968.

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. 2001. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KOERICH, P. K. V.; VAZ, A. K. **Comparação de antígenos utilizados no diagnóstico de *Brucella ovis*.** Lages. 2002. Disponível em: <<http://www.cav.udesc.br/main.php?op=rca/index2.php>>. Acesso em: 20.jul.2003.

KRT, B. Evaluation of the more important serological methods for diagnosing ovine brucellosis – *Brucella ovis* infection. **Zb. Vet. Fak. Univ. Ljublj.**, Ljubljana, v.30, n.1, p. 41-51, 1993.

LISLE, W. G.; CARMICHAEL, L. E. A plate Agglutination Test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.35, n.7, p.905-909, 1974.

MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests. In: NILSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis.** Boca Raton: CRC Press, 1990. p.154-300.

MAGALHÃES NETO, A. et al. Prevalência da brucelose ovina em carneiros de 50 rebanhos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16., 1991, Santos, **Resumos...**Santos, 1991.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.16, p.75-79, 1996.

MARÍN, C. M. et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. **Vet. Rec.**, London, v. 125, n.20, p.504-508, 1989.

MARINHO, M.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.16, p.45-48, 1996.

MATUKUMA, C. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Testes sorológicos na clínica de pequenos animais. **Rev. Clínica Vet.**, São Paulo, ano 2, n.8, p.20-23, 1997.

MORAES, C. C. G. **Prevalência de anticorpos anti-*brucella canis* em cães da Microregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo.** Botucatu, 2000. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MORIYON, I. Estructura antigênica del genero *Brucella*. **Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza**, p.39-53, 1988.

MUHAMMED, S. L. et al. Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. **Cornell Vet.**, Ithaca, v.65, p. 221-227, 1975.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis.** Boca Raton: CRC Press, 1990, 453p.

NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. **Biostatistics: the base essentials.** St. Louis: Mosby Year Book, 1994. 260p.

NUNEZ-TORRES, E. 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.

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: 04. jul. 2003.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIE - OIE. **Terrestrial Animal Health Code.** 2003. Prescribed and alternative diagnostic tests for list A and list B diseases. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A_00123.htm>. Acesso em: 04.jul.2003.

RAHALEY, R. S. et al. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. **Vet. Rec.**, London, v.113, p.467-470, 1983.

RAMOS, A. A. et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v.1 p.211-213, 1966.

RAMOS, E. T. et al. Epididimite ovina em carneiros vasectomizados. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. **Anais...** Gramado, 1992a. p. 88.

RAMOS, E. T. et al. Epididimite ovina em propriedades do município de Uruguaiana. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. **Anais...** Gramado, 1992b. p. 89.

RAMOS, E. T. et al. Epididimite ovina em Santana do Livramento: exames sorológicos e bacteriológicos. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. **Anais...** Gramado, 1992c. p. 90.

RIS, D. R. The complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in sheep. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v.22, p.143-146, 1974.

ROBLES, C. A. et al. Ovine brucellosis in Merino flocks in Chubut province, Argentina. **Vet. Argent.**, Buenos Aires, v.10, n.97, p.460-461, 1993.

ROBLES, C. A. Evaluacion de uma tecnica de doble difusion em gel de agar para el diagnostico de la infeccion por *Brucella ovis* em carneros. **Vet. Argent.**, Buenos Aires, v.15, n.142, p.119-124, 1998.

ROBLES, C. A. et al. Epidemiological observations in a corriedale flock affected by *Brucella ovis*. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v.22, n.7, p. 435-443, 1998.

ROJAS, X. et al. Brucelosis ovina. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v.22, n.1, p.55-63, 1990a.

ROJAS, X. et al. Diagnóstico de brucelosis ovina por técnica de enzimoimunoensayo en papel de nitrocelulosa. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v.22, n.2, p.135-142, 1990b.

SILVA, J. B. A. et al. Ocorrência de brucelose ovina causada por *B. ovis* pelo método de imunodifusão em ágar gel em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 28., 2001, Gramado. **Anais...** Gramado, 2001. p.168.

SUAREZ, C. E. et al. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.18, p.349-356, 1988.

VIEGAS, E. A. et al. Investigação sorológica para brucelose em caprinos e ovinos, no estado da Bahia. **Arq. Esc. Med. Vet. Univ. Fed. Bahia**, Salvador, v.5, n.1, p. 84-98, 1980.

VIGLIOCCO, A. M. et al. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.54, p. 357-368, 1997.

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

WEST, D. M. 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.**, Wellington, v.41, n.2, p.82-86, 1993.

WORTHINGTON, R. W. et al. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v.33, p.84-86, 1985.

8 - ANEXOS

ANEXO I

Tampão Borato

Ac. Bórico (H_3BO_3) _____	1,86 g
Cloreto de Potássio(KCL) _____	7,25 g
H ₂ O destilada _____	950 ml

Após a mistura dos reagentes, Agitou-se até a dissolução total e ajustou-se o pH para 8,3 com NaOH 0,2 M, completando o volume para 1 litro com H₂O destilada.

Gel

Agarose ou Ágar noble _____	1 g
Tampão Borato _____	5 ml
Solução 50% NaCl _____	93 ml

Adicionou-se 1 ml Azida Sódica a 1 % e homogeneizou-se. A solução foi fervida em banho-maria até que o gel ficasse translúcido e homogêneo. Despejou-se o gel quente em placas e deixou-se esfriar no ambiente. As placas foram tampadas após sua completa solidificação, permanecendo posteriormente 30 min. na geladeira, antes de perfurar. As placas foram utilizadas em até 24 horas após a solidificação..

ANEXO II

AVALIAÇÃO SANITÁRIA DO REBANHO

I – Identificação da Propriedade

- 1- Município: _____
- 2- Nome do Proprietário: _____
- 3- Endereço do Proprietário: _____

II – Dinâmica da População

- 1- Número total do rebanho ovino: _____
- 2- Aquisição de animais? leilões(), exposições(), propriedades vizinhas(), outras() OBS.: _____
- 3- Ao introduzir novos animais na propriedade:
 - 3.1- Usa quarentena? ()sim ()não
 - 3.2- Realiza testes sorológicos para Brucelose? ()sim ()não
 - 3.3- Tem conhecimento sobre a doença? ()sim ()não ()já ouviu falar

III- Performance Sanitária

- 1- Ocorrência de aborto? ()sim ()não
- 2- Nascimento de crias mortas ou debilitadas? ()sim ()não
- 3- Observação de epididimite? ()sim ()não