

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

LOURIVAL SOUZA SILVA JUNIOR

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE OVINOS
INOCULADOS COM UM ANTÍGENO DE *BRUCELLA OVIS*

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JANEIRO - 2016

LOURIVAL SOUZA SILVA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE OVINOS
INOCULADOS COM UM ANTÍGENO DE *BRUCELLA OVIS***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JANEIRO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

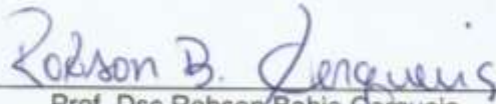
--

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LOURIVAL SOUZA SILVA JUNIOR

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE OVINOS INOCULADOS COM UM
ANTÍGENO DE *BRUCELLA OVIS*



Prof. Dsc. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Dr. Thiago Sampaio Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dsc. Fred da Silva Julião
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Cruz das Almas, 04 de janeiro de 2015.

Dedicatória

Aos meus pais, Lourival Souza e Sônia Dias, a minhas irmãs Larissa Souza e Lorena Souza e, a minha namorada Bianca Pimentel, pelo apoio e amor incondicional.

Agradecimentos

A Deus por minha vida, por seu amor infinito, e por me abençoar e me dar forças para realizar meu trabalho e vencer os obstáculos.

A toda minha família, pelo apoio, demonstrações de carinho e orações, em especial aos meus pais Lourival e Sônia, minhas irmãs Larissa e Lorena, minha avó Maria José, meus cunhados Rafa, Tarciso e Carol, meus sogros Valdomiro e Rosenilda e minha namorada Bianca, amo muito todos vocês.

Ao meu orientador professor Robson Bahia Cerqueira que me acolheu durante esses anos, abrindo portas, me deu confiança e me passou muito conhecimento.

Ao grupo de pesquisa em infectologia e saúde veterinária, por todos os ensinamentos, companheirismo e amizades verdadeiras.

Aos professores que me ajudaram, incentivaram, aconselharam e passaram todo o conhecimento.

Aos funcionários / amigos, Sr. Hélio, Roque, Ana Paula, Tibério e Carmo, pela ajuda e amizade.

Aos amigos verdadeiros, companheiros e colegas da Universidade que participaram de forma direta e indireta da minha formação.

Aos demais amigos que, de alguma forma me ajudaram nesse período aqui em Cruz das Almas.

Muito obrigado!

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank Clark

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 Introdução	12
2 Revisão de literatura	14
2.1 Agente etiológico	14
2.2 Características morfológicas	15
2.3 Aspectos antigênicos	15
2.4 Epidemiologia	16
2.5 Transmissão	18
2.6 Patogenia	19
2.7 Resposta imune	20
2.8 Sinais clínicos	22
2.9 Diagnósticos laboratoriais	23
2.9.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)	24
2.9.2 Ensaio imunoenzimático	24
2.9.3 Técnicas moleculares	25
2.10 Vacinas	26
2.11 Medidas de controle e prevenção	29
3 Objetivo	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31

4 Metodologia	32
4.1 Local do estudo e Amostras	32
4.2 Produção do antígeno para inoculação	32
4.3 Inoculação e coletas	33
4.4 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISAI) com antígeno comercial	36
5 Resultados	38
6 Discussão	43
7 Conclusão	45
Referências	46

Resumo

A Brucelose ovina é uma enfermidade de caráter crônico, infectocontagiosa, cujo agente etiológico é a bactéria da espécie *Brucella ovis*. Tem como sintomatologia epididimite, orquite e é responsável por abortos em fêmeas, além de ocasionar nascimento de animais fracos e morte perinatal. Essa doença causa grandes prejuízos ao sistema de produção, pois interfere na eficiência reprodutiva. Para reduzir a ocorrência de brucelose ovina, é necessário que o diagnóstico seja precoce. Para isso, faz-se importante a realização de testes sorológicos, que são utilizados no programa de controle e erradicação da doença, como o ensaio imunoenzimático ELISA indireto. Ainda não existe nenhuma vacina específica para ser utilizada na prevenção da *B. ovis*. Logo, objetivou-se realizar avaliação da resposta imune humoral de ovinos inoculados com um antígeno de *B. ovis*, visando a sua possível utilização como vacina. O experimento foi desenvolvido em uma propriedade situada no município de Ribeira do Pombal-BA. Foram utilizados 85 ovinos divididos em três grupos (Grupo 01, Grupo 02 e Grupo 03). No dia zero (antes da inoculação do antígeno nos animais), realizou-se a coleta de sangue para a sorologia e confirmação de que todos estavam não reagentes para a enfermidade. Em seguida, realizou-se a inoculação dos animais com o antígeno diluído em Glicerina líquida, dividindo da seguinte maneira: o Grupo 01 foi inoculado com 0,5ml da diluição; o Grupo 02, com metade da dose, ou seja, 0,25ml; e o Grupo 03, (grupo controle), foi inoculado com 0,5ml de solução fisiológica. As coletas de sangue foram realizadas a cada 30 dias, no período de um ano e com avaliação da resposta humoral utilizando-se o teste ELISA indireto, através da Densidade Óptica (D.O.). Nos resultados encontrados, os animais do grupo controle apresentaram D.O. baixa no início do estudo e, assim se mantiveram durante todo o período. Já os grupos tratados (grupos 01 e 02) apresentaram D.O. baixa no início do experimento, porém, após 24 horas da inoculação já apresentavam resposta imunológica contra o antígeno inoculado. Os dois grupos tratados demonstraram produção de anticorpos, porém, o grupo 01 mostrou produção de anticorpos mais eficiente que o grupo 02. O antígeno de *B. ovis* demonstrou estimular uma resposta humoral nos animais inoculados ao longo do tempo, sendo possível sua utilização como vacina contra a infecção da brucelose ovina.

Palavras-chave: Brucelose ovina, Ovinocultura, Imunologia, Vacinas.

Abstract

The sheep Brucellosis is a chronic disease, infectious, whose etiologic agent is the bacterium of the species *Brucella ovis*. Its symptoms epididymitis, orchitis and is responsible for abortions in females, in addition to causing birth of weak animals and perinatal death. This disease causes great damage to the production system, because it interferes at the reproductive efficiency. To reduce the ovine brucellosis is necessary that the diagnosis is early, for this makes it important to carry out serological tests, which are used to control and eradication program of the disease, such as enzyme-linked immunoassay indirect ELISA. There is no specific vaccine to be used in the prevention of *B. ovis*. Therefore, the objective was to perform evaluation of the humoral immune response of sheep injected with an antigen of *B. ovis*, with a view to its possible use as a vaccine. The experiment was conducted in a property located in the municipality of Ribeira do Pombal, Bahia. 85 sheep were used, divided into three groups (Group 01, Group 02 and Group 03). On day zero (before the animal antigen inoculation) was held to collect blood for serology and confirmation that all were non-reagents for the disease. Was subsequently performed inoculation of animals with the antigen diluted in Liquid Glycerin, dividing as follows: in Group 01 - 0.5 ml of the dilution was inoculated; Group 02 half dose, 0.25ml; and Group 03, which was the control group was inoculated 0.5 ml of physiological solution. The blood samples were taken every 30 days, in the 01 years period and evaluated the humoral response using indirect ELISA test by Optical Density (OD) at the beginning of the experiment and, was maintained throughout the period. Already treated groups (groups 01 and 02), presented DO low at the beginning of the experiment, however, 24 hours after inoculation already had immune response against the antigen inoculated. The two treated groups showed antibody production, however, the group 01 showed more efficient production of the antibodies 02. Group *B. ovis* antigen has been shown to stimulate a humoral response in inoculated animals over time, being possible its use as a vaccine against infection of ovine brucellosis.

Keywords: ovine brucellosis, Ovine, Immunology, Vaccines.

1 Introdução

O Brasil tem um rebanho de ovinos estimado em 17,291 milhões de cabeças. Quanto à participação regional, 56,5% dos animais se encontram na Região Nordeste; 30,0% na Sul; 5,5% na Centro-Oeste; 4,2% na Sudeste; e 3,8% na Norte. O maior efetivo encontra-se nos estados do Rio Grande do Sul (24,6%), Bahia (16,9%), Ceará (11,9%) e Pernambuco (10,6%). Na região Nordeste, a principal finalidade da criação é a produção de carne e pele, enquanto na Região Sul, é a produção de lã. Comparando-se os dados de 2012 e 2013, a região Nordeste teve um crescimento em seu rebanho ovino de 4,8% e, nos últimos anos, a criação de caprinos e de ovinos vem sendo estimulada na região Nordeste por diversos segmentos da cadeia produtiva, tendo como vantagem a adaptação desses animais à região, demonstrando ser uma características da criação (área necessária e investimentos menores que em outras criações), além do avanço tecnológico alcançado e do mercado de carne, leite e pele, tornam essa atividade atraente aos produtores da região (BRASIL, 2013).

A brucelose ovina, conhecida também como Epididimite Ovina, é uma enfermidades que acomete ovinos, causada pela bactéria *Brucella ovis* que provoca uma doença de caráter infectocontagioso, caracterizada por epididimite nos machos, abortos ocasionais nas fêmeas, mortalidade perinatal de cordeiros e diminuição na eficiência reprodutiva dos rebanhos, provocando elevadas perdas econômicas (NOZAKI *et al.*, 2004; MAGALHÃES NETO; GIL-TURNES, 1996; SILVA *et al.*, 2003; ISHIZUKA; LEITE; DINIZ, 2007; CARDOSO *et al.*, 1989).

Foi inicialmente diagnosticada no início da década de 50 na Nova Zelândia e Austrália, espalhando-se em seguida pela Tchecoslováquia, Canadá, África do Sul, Estados Unidos, Uruguai, Romênia, Bulgária, Hungria, Rússia e Brasil. Já foi encontrada em todo mundo, no Brasil, os primeiros carneiros com epididimite foram diagnosticados no Rio grande do Sul em 1966. Estima-se que seja uma doença de distribuição geográfica cosmopolita (BUDDLE, 1956; RAMOS *et al.*, 1966; PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003; ISHIZUCA; LEITE; DINIZ, 2007).

A principal forma de transmissão é a venérea passiva, onde machos sadios se infectam cobrindo ovelhas previamente cobertas por carneiros infectados. Também pode ocorrer a transmissão de carneiro para carneiros, quando os machos dominantes saltam sobre os dominados, ou através da lambedura do prepúcio. As fêmeas podem eliminar o agente pelas descargas vaginais ou pelo leite, mas, demonstram relativa resistência a infecção (NOGUEIRA; FERRARI; CURCI, 2007; RAMOS *et al.*, 1966).

Pode-se caracterizar a brucelose nas suas formas de evolução aguda e focalizada. A aguda caracteriza-se pela tríade sintomática de febre, sudação profusa e dor. Já na forma localizada distinguem-se por longa evolução marcada por frequentes recidivas. Na fêmea, a principal consequência da brucelose ovina é aborto ou nascimento de cordeiros fracos (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003; SANTOS; POESTER; LAGE, 2005). Não é observada, como regra, a ocorrência de hiperemia no animal infectado por *B. ovis*, é possível que ocorra, talvez, elevação da temperatura local causada pela inflamação em nível de epidídimo (CARDOSO *et al.*, 1989).

A vacinação é recomendada para o controle da doença, sendo as vacinas o método mais econômico de controle de disseminação de doenças. A vacina viva de *B. melitensis* Rev. 1 tem sido referida como a melhor vacina disponível até o momento (MARTINS *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009). No Brasil, ainda não existe vacina contra *B. ovis*, necessitando-se estudar antígenos que possam ser capazes de desencadear resposta humoral eficiente, e serem utilizados como vacina no controle dessa enfermidade. Assim, objetivou-se com esta pesquisa, estudar um antígeno de *B. ovis* visando sua utilização como vacina, auxiliando no controle dessa enfermidade e, conseqüentemente, diminuir as perdas causadas por esse micro-organismo.

2 Revisão de literatura

2.1 Agente etiológico

Bactérias do gênero *Brucella* pertencem à classe Proteobacteria, são pequenos cocobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos, não capsulados, imóveis, aeróbios, possuindo metabolismo do tipo respiratório (BATISTA et al., 2011; GOMES, 2013; NOGUEIRA et al., 2006; PESSEGUEIRO et al. 2003). Possuem sistema citocromo, e como aceptor final de elétrons, oxigênio ou nitrato e, sendo assim, nitrato redutase é produzida. No cultivo primário, algumas amostras precisam de anaerobiose para crescer. Quando cultivadas em ágar dextrose ou um meio sem suplementação de sangue, as colônias apresentam-se transparentes, elevadas, convexas com bordos inteiros, lisas e de superfície brilhante (GOMES, 2013). Acomete ruminantes, suínos, caninos e diversas espécies de vida selvagem (BLASCO & MOLINA- FLORES, 2011). As principais espécies que compõe esse gênero são: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* e *B. maris*, sendo as três primeiras consideradas zoonóticas (PESSEGUEIRO et al., 2003; BLASCO, 2006).

A *B. ovis* é uma espécie rugosa e estável que morfologicamente se caracteriza como pequenos cocos bacilos, de aproximadamente 0,5-0,7 por 0,6 - 1,5 µm, geralmente solitários, podendo raramente formar cadeias curtas. É cultivada em ambiente de 10% de anaerobiose para isolamento primário. A brucelose ovina causa doença genital caracterizada por epididimite em carneiros e placentite, abortos e infertilidade nas ovelhas causando redução na fertilidade do rebanho (LÓPEZ et al., 2006; BLASCO, 1990).

2.2 Características morfológicas

B. ovis e *B. canis* são espécies conhecidas como rugosas (OIE, 2015). Característica diretamente relacionada com a composição química da parede celular, que é envolvida por uma estrutura lipopolissacarídica, apresentando em sua porção mais externa uma cadeia polissacarídica chamada de cadeia O. Brucelas consideradas rugosas, não apresentam a cadeia O (NOGUEIRA et al., 2006).

O crescimento dessa espécie ocorre em meios base (Trypticase Soy Agar, Ágar Sangue e Ágar Columbia) acrescidos com 5 % a 10 % de sangue, ou pode ser semeado no meio modificado de Thayer-Martim, que é um meio seletivo (ALTON et al., 1976; BROWN et al., 1973). Ainda, é necessário ter uma atmosfera modificada no cultivo primário, cerca de 10 % a 20 % de anaerobiose na temperatura de 34°C a 37°C, porém, pode ser isolada cepa independente da anaerobiose. A visualização da colônias torna-se possível decorridos três a cinco dias de incubação, visualizando-se pequenas colônias, circulares com borda regular, de aparência opaca e coloração entre branco e marrom (MEYER, 1982; ALTON et al., 1988).

Com relação a morfologia, propriedades de coloração e características culturais, a *Brucella ovis* é semelhante às outras espécies do gênero *Brucella*, exceto que tem reações negativas para os testes de oxidase e urease (OIE, 2015).

2.3 Aspectos antigênicos

As bactérias do gênero *Brucella* são compostas por membrana citoplasmática interna, espaço periplasmático e membrana externa constituída de lipossacarídeos (LPS), que é o antígeno de superfície de maior importância das bactérias gram-negativas, além de outras proteínas principais. A superfície das bactérias desse gênero, varia de acordo sua fase, podendo ser classifica-la como lisa ou rugosa. As bactérias denominadas como lisas, possui na sua constituição lipopolissacarídeos

(LPS-S) que contém lipídeos A ou M, oligossacarídeo central e, mais exposta, uma cadeia polissacarídica chamada de cadeia O (MORIYON, 1988). Já as rugosas, sua camada de LPS (LPS-R) é praticamente semelhante ao das lisas, porém, não possui cadeia O (BLASCO, 1990). Desta forma, a cadeia O não recobre os antígenos da superfície da membrana da *B. ovis*, fazendo com que fiquem expostos. O antígeno 29-kDa tem em sua composição duas OMPs, a Omp25 e a Omp31 (VISCAÍNO et al., 2001). Desses dois antígenos, o que está diretamente ligado aos processos pelo qual a bactéria passa para causar infecção e manter-se nas células do hospedeiro é a Omp25 (MARTÍN-MARTÍN et al., 2008; CARO-HERNÁNDEZ et al., 2007).

2.4 Epidemiologia

A *B. ovis* tem distribuição universal e sua ocorrência varia de acordo com diferentes fatores como região (sistema de produção), raça, idade e sexo dos animais (BURGESS, 1982). Tem sido relatada em países americanos e europeus e, também na Austrália, Nova Zelândia e África do Sul, mas provavelmente ocorre na maioria dos países de criação de ovelhas (OIE, 2015). Naturalmente infecta os ovinos, sendo os machos mais susceptíveis que as fêmeas. Os carneiros infectados são as principais fontes de disseminação do patógeno nos rebanhos, que apresentando ou não lesões, podem transmitir a enfermidade para outros animais do mesmo sexo, através de um hábito comum da espécie, que é saltar em outros animais, predispondo a penetração da bactéria via retal, apesar de a via oral ser a mais comum de transmissão de um macho para o outro, através da lambertura do prepúcio (BULGIN e ANDERSON, 1983; BULGIN, 1990; NÁREZ et al., 1999; QUISPE et al., 2002; TAMAYO et al., 1989). Carneiros persistentemente infectados eliminam a bactéria no sêmen por um longo período, variando entre 2 a 4 anos (CFSPH, 2007).

Silva et al. (2009) relatam a ocorrência de *B. ovis* no estado da Bahia de 3,27%, analisando amostras de soros de 183 ovinos, afirmando que não houve diferença significativa entre a idade e o sexo dos animais testados. Resultados

diferentes foram encontrados por Souza et al. (2012), que analisaram 694 amostras de ovinos do semiárido da Bahia, das quais apenas 0,72% delas mostraram presença de anticorpos contra *B. ovis*, supondo que essa queda no número de animais reagentes seja devido ao tipo de criação (extensiva) e animais rústicos, adaptados a esse sistema de criação.

A infecção por *B. ovis* pode ocorrer em animais jovens, sendo os machos que tenham atingido a maturidade sexual são mais susceptíveis (BURGESS, 1982; WALKER et al., 1986), porém, Bulgin (1990) relata a infecção de cordeiros que nunca foram utilizados na reprodução e que não tiveram contato com carneiros que tenham sido utilizados como reprodutores.

Em fêmeas portadoras da enfermidade, podem excretar a bactéria através de descargas vaginais, colostro e, conseqüentemente, transmissão através da lactação (LIRA, MEGID, 2009; BAIGÚN et al., 2000). Por esses motivos, as fêmeas também são relevantes na epidemiologia da infecção, tendo que ser levado em conta em programas de erradicação da epididimite ovina (BLASCO, 2011; GRILLÓ et al., 1999). Um fato importante para epidemiologia é a aglomeração de animais, sendo propriedades com rebanho acima de 1000 ovinos apresentam um número maior de animais infectados (TAMAYO et al., 1989).

Bactérias do gênero *Brucella* sobrevivem em solo úmido, água, leite e urina até quatro meses, resiste, ao congelamento e descongelamento. Porém, não resistem a desinfetantes comuns, como glutaraldeído, álcool à 70%, hipoclorito, isopropanol, compostos fenólicos, formaldeídos, iodóforos e xileno. Esses produtos, tem baixa eficiência na presença de matéria orgânica e baixa temperatura (Walker, 2003).

2.5 Transmissão

A transmissão da *Brucella ovis* se dá por as vias oral, conjuntival, prepucial, vaginal e retal, sendo a mais comum a transmissão venérea. Entretanto, as ovelhas infectadas excretam a bactéria através de descarga vaginal, podendo também eliminá-la através do leite, causando infecção de cordeiros (LIRA, MEGID, 2009; BAIGÚN et al., 2000).

A transmissão pode ocorrer, principalmente, devido à monta natural, quando uma ovelha, em estro, é coberta por um carneiro infectado e, nesse mesmo período, um carneiro susceptível copula com essa fêmea. Assim, a fêmea torna-se fonte de infecção passiva para a transmissão da *B. ovis* (PAOLICCHI et al., 1991; BROWN et al., 1973). Ovelhas portadoras de brucelose representam um risco para os machos no período de monta, podendo haver eliminação de *B. ovis* nas secreções vaginais (MARCO et al., 1994). Após infectar os carneiros, a *B. ovis* pode colonizar por longos períodos as glândulas sexuais acessórias sem causar a epididimite, tendo a ocorrência desses animais infectados sem apresentar lesões, no entanto disseminando o microrganismo através do sêmen (BAIGÚN et al., 2000; WALKER, 2003).

A infecção de um macho para o outro pode ocorrer, através de um hábito comum da espécie de saltar em outros animais predispondo a penetração da bactéria via retal, porém, a via oral demonstra-se ser a mais comum dessa forma de transmissão, através da lambedura do prepúcio (BULGIN e ANDERSON, 1983; BULGIN, 1990; NÁREZ et al., 1999; QUISPE et al., 2002; TAMAYO et al., 1989).

Ainda, pode haver transmissão para animais que não tenham atingido a maturidade sexual, ou seja, animais “virgens”, através do contato com urina de animais infectados, quando estabulados. Por essa forma de infecção, a bactéria vai penetrar no animal através de ferida ou escoriações, mucosas oral e nasal e, conjuntiva (BROWN et al., 1973; ALTON et al., 1988; BULGIN, 1990).

Outra forma de transmissão da brucelose é a por ingestão da bactéria através de alimentos contaminados, não sendo levado com muita importância para *B. ovis* quando comparado as outras espécies de *Brucella*. Porém, Gil Turnes (1998) diz ser possível encontrar a *B. ovis* de secreções uterinas de ovelhas até dez dias após o aborto, sendo questionada a infecção por ingestão de água e pasto contaminados com urina, sêmen e restos de parto oriundos de animais infectados (RIDLER et al., 2002).

2.6 Patogenia

A *B. ovis*, como as outras espécies do gênero, penetra no organismo através das membranas das mucosas ou lesões na pele (BULGIN et al., 1990; GRILLÓ et al., 1999; PAOLICCHI, et al., 2000). Em seguida, a *B. ovis* é englobada por células fagocitárias, direcionando-se aos gânglios linfáticos aferentes, onde ocorre a proliferação da bactéria. Em fase de bacteremia, atinge a corrente sanguínea e migram para os órgãos sexuais, além de causar infecção em todo o organismo, como fígado, baço, pulmões, rins e outros linfonodos, multiplicando-se nesses órgãos, sendo eliminada à medida de que vai sendo destruída (BIRBERSTEIN et al., 1964; LIRA, MEGID, 2009; QUINN et al., 2005; WALKER, 2003). Ocorrendo essa eliminação, estimula o sistema imunológico do animal a produzir Imunoglobulina G, que será identificada na realização do diagnóstico sorológico (GIL-TURNES, 2001). A *B. ovis* invade as células através de receptores de moléculas que contém resíduos sulfatados ou ácido siálico, que mantem-se por pouco tempo após a fixação em células atacadas (CASTANEDA-ROLDAN et al., 2004).

Nos carneiros, a *B. ovis* tem predileção pelas ampolas e vesículas seminais, e epidídimo, ocasionando baixa qualidade seminal devido à diminuição de espermatozoides viáveis e concentração (PAOLICCHI, et al., 2000; MANTEROLA et al., 2003; LIRA, MEGID, 2009). Nas ovelhas, os órgãos de eleição da bactéria são os linfonodos ilíacos, útero, glândula mamária e baço. Antes que ocorra evidencia dos sinais clínicos, a bactéria permanece latente por muito tempo, como na

infecções causadas por as outras espécies de *Brucella* (THOEN e ENRIGHT, 1986).

A *Brucella ovis* consegue sobreviver dentro dos macrófagos, favorecendo sua persistência nos tecidos. Após sua penetração e colonização nos linfonodos regionais, em média de trinta dias, a bactéria produz bacteremia e coloniza o sistema reprodutor (BIBERSTEIN et al., 1964; PAOLICCHI, 2001). Na gestação, quando as membranas fetais estão em desenvolvimento, a *B. ovis* atinge o útero colonizando o epitélio coriônico, que vão se multiplicar e destruir as células. Em seguida, as bactérias vão se espalhar pelo espaço útero-corial e invadir células epiteliais, causando necrose do epitélio coriônico, inflamação do mesênquima, vasculite difusa e, conseqüentemente obliteração vascular, isquemia e necrose dos cotilédones e cório-alantóide (HARTLEY, 1961).

2.7 Resposta imune

Logo após infecção, inicia-se um processo de ativação inespecífica do sistema imune que se tornará fundamental para interromper ou não a multiplicação do microrganismo (ZHAN et al., 1996). A infecção por *B. ovis* induz uma resposta imune celular e humoral. As células responsáveis por essa resposta são as células B e T (TCD4+ e TCD8+), além das citocinas (CORBEL, 1997). A variação da duração da resposta imune depende, principalmente, da carga infectante, poder de virulência, resposta do hospedeiro, sendo essa última vai depender da idade do animal, estado imunitário, sexo, e nas fêmeas do tempo de gestação (GOLDING et al., 2001).

O que desencadeia a resposta imunológica são os glicolipídeos, peptidoglicanos e LPS (Lipopolissacarídeos) presentes na parede celular da bactéria, que fazem com que o sistema imune do hospedeiro os reconheçam (TIZARD, 1996). O LPS da *Brucella*, quando comparado com outras bactérias gram-negativas, é menos ativa (COELHO et al., 2014). Por esse motivo, a resposta imune

inata causa uma baixa resposta inflamatória, retardando a resposta imune eficiente (LAPAQUE; FORQUET; CHASTELLIER, 2006).

A imunidade adquirida é dividida em três fases: As células TCD4+ e TCD8+ produzem Interferon Gama (IFN- γ), que por sua vez ativa, nos macrófagos, sua função bactericida, impedindo que a *B. ovis* sobreviva dentro da célula. Em seguida, as citocinas produzidas pelos linfócitos TCD8+, provocam destruição dos macrófagos infectados. E por último, os isótipos dos anticorpos IgG2 e IgG3, no intuito de facilitar a fagocitose, opsonizam os patógenos (GOLDING et al., 2001).

A resposta imune humoral, consiste na produção de anticorpos. No período inicial, entre 3 a 4 semanas, ocorre o aumento de IgM e, passados 7 a 14 dias pós infecção, há aumento gradual de IgG e IgA, regridem após o hospedeiro se recuperar (YOUNG, 1995). Esses anticorpos produzidos para debelar a infecção são relativamente ineficazes para as brucelas, devido sua capacidade de produzir adenina e guanina monofosfato, causando a inibição da fusão dos lisossomos com os fagolisossomos, permitindo sua multiplicação em ambiente sem a presença de anticorpos, no interior de macrófagos (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; TIZARD, 1996). Assim, a defesa da infecção causada por essa bactéria, vai está ligada a resposta imune celular, sendo as células T responsáveis pela imunidade contra bactérias intacelulares (GOLDING et al., 2001; WYCKOFF, 2002).

Os fagócitos mononucleares são extremamente importantes na defesa celular dessa bactéria (BALDWIN et al., 1994). Essa importância ocorre, pois quando os fagócitos mononucleares entram em contato com a bactéria, induzem a produção de interleucina 1 e 12 (IL-1 e IL-12) e TNF- α (fator de necrose tumoral). A IL-12 (bastante induzida pelas brucelas) ativa as células NK (*natural killer*) e, em seguida, a produção de IFN- γ (CARON et al, 1994; ZHAN et al., 1995; ZHAN et al. 1996). As células TCD4+ e TCD8+ são responsáveis pela produção de IFN- γ e, também, as células T *helper* são responsáveis por produzirem IL-2 e IL-10,

mantendo o aumento de macrófagos, linfócitos B e células TCD8⁺ (ZAITSEVA et al., 1995;. TIZARD, 1996).

Os macrófagos adquirem capacidade de destruição dessa bactéria dez dias pós infecção. Após isso, o IFN- γ possui responsabilidade na ativação de macrófagos, que vai provocar um aumento de volume, aumento nos seus movimentos e no metabolismo, causando metabólitos capazes de agir na eliminação do micro-organismo. Quando os lisossomos aumentam seu volume, adquirem a capacidade de dispor de enzimas hidrolíticas, assim, vão liberar grandes quantidades de IL1, que por sua vez, possuem capacidade de ativar linfócito B e células T auxiliares. Esses mecanismos acontecem para que a célula aumente sua atividade bactericida e destrua a bactéria alojada em seu interior (TIZARD, 1996).

Existe uma diferença natural na resposta dos macrófagos, entre as bactérias do gênero *Brucella*. A cadeia O da LPS das bactérias lisas está ligada a uma resistência de sobrevivência mais eficiente do que as rugosas, que não possuem cadeia O, que funciona como indutor de mitose das células do baço, que vão multiplicar-se para auxiliar na defesa contra a infecção, fato importante na resposta imune celular. O LPS é um forte indutor de produção de IL-10, porém, sozinho não consegue ativar TCD4⁺ a liberar IL-12 (KARIMINIA et al., 2002).

2.8 Sinais clínicos

A brucelose ovina causa lesões genitais que acarretam infertilidade dos machos ou subfertilidade. O primeiro sinal nos carneiros é uma diminuição acentuada da qualidade do sêmen, que pode conter leucócitos e brucelas (RADOSTITS et al., 2002; MANAZZA et al., 2006), causando diminuição da fertilidade, podendo levar ao descarte de animais de alto valor genético (MANAZZA et al., 2006). Ainda, na síndrome aguda pode ser acompanhada por edema e inflamação do escroto, além de uma reação sistêmica com febre, depressão e aumento da frequência respiratória (RADOSTITS et al., 2002).

Regredindo a síndrome aguda, decorrido um longo período de latência, vai ocorrer lesões no epidídimo e nas túnicas dos testículo, uni ou bilateral. Palpação dos dois testículos, ao mesmo tempo, por trás do animal é a melhor maneira de realizar o exame, os quais vão apresentar: epidídimo com aumento de volume e firme, principalmente na região da cauda; espessamento e enrijecimento das túnicas escrotais; geralmente, atrofia do testículo (LIRA & MEGID, 2009; MANTEROLA et al., 2003; PAOLICCHI, et al., 2000).

Nas ovelhas, geralmente são observados poucos sinais clínicos, ocorrendo colonização bacteriana das mucosas da vagina e do útero, provocando vaginite e endometrite. Ovelhas em início de gestação quando infectadas, na maioria das vezes, essa infecção não resulta em abortamento (RADOSTITS et al., 2002). No entanto, quando são adquirem a brucelose em período de gestação avançado, a infecção vai causar nascimento de borregos fracos ou prematuros, podendo morrer logo após o nascimento e, os que sobrevivem tem grande chance de serem portadores da brucelose, que irá manifestar sinais clínicos quando esses animais atingirem sua puberdade (ESTEIN, 1999; HOMSE et al., 1995; MEDEIROS et al., 2005; RADOSTITS et al., 2002).

2.9 Diagnósticos laboratoriais

O diagnóstico considerado como “Padrão Ouro” é o isolamento e identificação da *B. ovis*. No entanto, tem um custo elevado, sensibilidade limitada, dificuldade para realizar o isolamento, comprometendo a sua utilização em programas de controle e erradicação da doença. Os métodos mais utilizados nos programas de controle e erradicação da *B. ovis* são os testes sorológicos (FERREIRA et al., 2003).

2.9.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

O IDGA é o teste considerado como padrão em vários países, sendo um deles o Brasil, para diagnóstico da brucelose ovina. Esse teste apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 96,4% e 100%, respectivamente, fácil execução, custo reduzido e, fácil de ser interpretado (MYERS; SINIUK, 1970). Estudos demonstram que o IDGA apresenta sensibilidade semelhante ao teste de Fixação de complemento (FC), além de ser de fácil execução (NIELSEN et al., 2004; ESTEIN et al., 2002; PRAUD et al., 2012). Mesmo sendo considerada como uma técnica fácil de ser executada e custos baixos, os resultados gerados podem ser inconclusivos (COLETO et al., 2003).

Segundo a OIE (2015), a Imunodifusão em Gel de Agarose, é considerada um método confiável para demonstrar ausência de infecção em uma população e para demonstrar ausência de infecção em animais individualmente. É recomendado para contribuir com as políticas de erradicação. E para confirmar casos clínicos e suspeitos além de determinar a prevalência da infecção, é considerado como um método correto.

2.9.2 Ensaio imunoenzimático

O teste ELISA apresenta alta sensibilidade e especificidade e, reprodutibilidade. Devido a essas características acabou se tornando, para um número alto de amostras ou até mesmo em pequenas quantidades de soros, o método mais escolhido, por mostrar bons resultados. O ELISA pode ser o indireto ou direto que vai detectar anticorpo e antígeno, respectivamente, ou sanduíche (competição), que detecta antígeno e anticorpo (DANTAS, 2004; JACQUES et al., 1998). No diagnóstico das bactérias do gênero *Brucella* pode ser utilizado o ELISA indireto ou ELISA de competição (JACQUES et al., 1998).

Greve et al. (2011) analisaram 90 amostras de soro de ovinos, das quais 45 dessas eram oriundas de animais que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença e, 45 amostras de animais sem sintomatologia clínica, todas as amostras submetidas aos teste do ELISA indireto e IDGA. Foi observado que no IDGA, 54 amostras apresentaram-se negativas, sendo que 09 dessas eram de animais doentes. Já no teste ELISA indireto, foi observado que as 45 amostras dos animais doentes mostraram-se positivas e, as outras 45 amostras, negativas, mostrando que, nesse estudo, o teste ELISA indireto mostrou-se superior ao IDGA, sendo capaz de detectar animais infectados e não infectados. Neste estudo, o teste ELISA indireto apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 95,6%.

Mesmo não havendo uma especificação a nível internacional, vários estudos demonstram que o teste ELISA indireto é mais sensível que o teste de Fixação de Complemento e, o IDGA. Observa-se, em alguns estudos, que o teste ELISA indireto mostra-se menos específico que o IDGA, característica que é dependente do protocolo utilizado (NIELSEN et al., 2004; ESTEIN et al., 2002; PRAUD et al. 2012).

Quando utilizado no intuito de demonstrar ausência de infecção em uma população, contribuir com as políticas de erradicação, demonstrar ausência de infecção em animais individualmente e determinar a prevalência da infecção, recomenda-se a utilização do teste ELISA indireto. No que se refere a confirmação de casos clínicos ou suspeitos, esse teste é considerado como um método confiável (OIE, 2015).

2.9.3 Técnicas moleculares

O diagnóstico da *B. ovis* através da PCR tem como finalidade detectar a presença de DNA de uma determinada amostra (BRICKER, 2002). O diagnóstico pela PCR pode ser realizado por várias técnicas, como PCR em tempo real, PCR combinatório e, PCR multiplex (AMOROSO, 2011; GUPTA et al., 2012; MIRNEJAD et al., 2013). Quando comparado com os testes sorológicos, as vantagens do PCR

são mais sensíveis e específicos, menos perigoso e, mais rápido (COELHO et al., 2014).

Ainda, pode haver falsos negativos, devido a vários fatores, como o número de amostras e, ausência de DNA na amostra testada, pois a eliminação da bactéria é intermitente; ou interferência ligada a extração de DNA direto da amostra, podendo haver contaminação do DNA extraído (COELHO et al., 2014).

A PCR, segundo a OIE (2015), é considerada como uma técnica confiável que pode ser utilizada em algumas situações, como confirmação de casos clínicos ou suspeitos. Nos outros requisitos (demonstrar ausência de infecção em uma população, contribuição com as políticas de erradicação, para demonstrar ausência de infecção em animais individualmente e determinar a prevalência da infecção), é classificado como não adequado para este propósito.

2.10 Vacinas

Vacinas são utilizadas com a finalidade de induzir a imunidade ativa, resultando da administração uma resposta biológica com produção de anticorpos, induzindo imunidade contra infecções pelo micro-organismo (ALMEIDA, 2008).

As vacinas utilizadas na veterinária são muito importantes na saúde e bem-estar animal, causando melhoras na produção de alimentos e, principalmente, na saúde pública. É um método de redução e prevenção de doenças de animais e infecções, via alimentos, de zoonoses em seres humanos, considerado de baixo custo e fácil aplicação, sendo sua utilização uma forma de segurança para sociedade. Sem as vacinas, seria impossível produzir alimentos de origem animal suficiente para alimentar a população mundial, além disso, as zoonoses teriam uma incidência muito maior (ROTH, 2011). Ainda, as vacinas reduzem a necessidade de utilização de antibióticos por evitar a infecção de animais de produção e companhia,

além de existir preocupações no que se refere a resistência de microrganismos devido ao uso desenfreado de antibióticos na medicina veterinária e humana (SINGER et al., 2003).

Existem vários tipos de vacinas, que são classificadas de acordo sua constituição e, são divididas das seguintes formas:

- Vacinas vivas atenuadas: Vacinas desse tipo podem ser vivas atenuadas ou virulentas, sendo a última, pouco utilizada. Para obter atenuação de um microrganismo são realizados vários procedimentos para que o mesmo perca o poder de causar a doença, como a temperatura, manipulação genética, inoculação em animais ou em cultivos celulares (FLORES, 2007; BUDDLE et al., 2011). Vacinas desse tipo demonstram ser eficiente, induzindo a resposta humoral e celular, e induz memória imunológica, fazendo com que as doses de reforço tenham um espaço de tempo maior (QUINN et al., 2005), porém, o consumo de alimentos oriundos de animais vacinados com esse tipo de vacina, é questionável devido ao fato de possuir possibilidade de reversão da capacidade de causar a doença, em animais imunossuprimidos, o que não é possível de acontecer quando se utiliza vacinas inativadas (BUDDLE et al., 2011; FLORES, 2007).

- Vacinas autógenas: São vacinas produzidas com material biológico de animais portadores da doença, sendo utilizadas quando em uma propriedade que ocorre uma enfermidade específica, havendo isolamento e identificação do agente causador, inativação do mesmo e utilizado com um adjuvante. Esse tipo de vacina é considerada como específica de cada propriedade. Possui a vantagem de permitir o tratamento de doenças que comercialmente não possuem vacinas específicas e, tratamento de infecções contínuas (BRASIL, 2003; NOLTE et al., 2001).

- Vacinas de produtos microbianos: Esse tipo de vacina pode ser classificada em três subtipos, como vacinas de material de proteínas nativas, de subunidades e, de produtos metabólitos modificados ou toxóides. As vacinas de subunidades são

produzidas através de fragmentos do patógeno, podendo ser recombinante, havendo mutação desse micro-organismo, sendo essa deleção ou inserção de um gene capaz de impedir a patogenicidade desse microrganismo (FLORES, 2007). As vacinas de produtos metabólitos induzem a produção de anticorpos que vão se ligar a esses toxóides que vão impedir a ligação com o receptor das células (SARI, 2010).

- Vacinas de DNA: São vacinas com um plasmídeo que contém um gene, sendo essas, frequentemente utilizadas em seres humanos. Essas vacinas, assim como as de subunidades, por serem mais seguras que vacinas vivas, os estudos são cada vez maiores, pois não vão causar a doença por não apresentarem indutoras de patogenicidade, além de não interferirem em teste de diagnóstico alérgico cutâneo (KANO et al., 2007; FOWLER et al., 2011).

- Vacinas de peptídeos sintéticos: Essa vacina consiste na utilização de peptídeos sintetizados, com a finalidade de gerar resposta imune. Esses peptídeos sintetizados vão mimetizar os epítomos, para que ocorra a interação dos antígenos com as células através da ligação celular-epítomo. Para que essa vacina seja eficiente, são necessárias intervenções, como a ligação de peptídeos sintéticos a proteínas maiores, devido só haver possibilidade de sintetizar os epítomos lineares e, na infecção natural, a maioria dos epítomos não são lineares (QUINN et al., 2005; FLORES, 2007).

- Vacinas inativadas: Esse tipo de vacina é obtida através da inativação de vírus ou bactérias através de mecanismos físico ou químicos. Nesta vacina pode haver indução de agregação de partículas que vão fazer com que alguns patógenos permaneçam vivos no interior do agregado. Promove uma baixa indução de resposta imune celular, apresentando maior capacidade de induzir a resposta imune humoral e, por isso, faz-se necessário a utilização de doses de reforço frequentes, para manutenção da resposta imune (QUINN et al., 2005).

O Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina (PNVCEO), não prevê o uso de vacina no controle da brucelose ovina (BRASIL, 2004). Como os carneiros e as ovelhas estão envolvidos na transmissão da doença, vacinar machos e fêmeas, em áreas com alta incidência da doença, é a maneira mais prática e econômica de controlá-la, a médio prazo. Para controles a longo prazo, devem ser consideradas reações cruzadas da vacina com os testes sorológicos (OIE, 2015).

Ainda não existe vacina específica para *B. ovis*. Porém, utiliza-se uma vacina oriunda de uma cepa de *B. melitensis* Rev. 1, que demonstra gerar imunidade contra a *B. ovis*. Tal vacina é utilizada em dose única de 1 ml contendo 10^9 Unidade Formadoras de Colônias (UFC), podendo ser administrada via subcutânea ou, 25 a 30 μ l via conjuntival em ovinos de três a cinco meses de idade. Quando vacinados via conjuntival, apresenta a vantagem de minimizar a intensidade da reação sorológica desencadeada pela via subcutânea, diminuindo a interferência em testes sorológicos (BLASCO, 1990). Quando inoculado em carneiros jovens ou adultos, raramente causa efeitos secundários (MUÑOZ et al., 2008; MARIN et al., 1990). Aconselha-se a vacinação de animais jovens e adultos com a vacina de *B. melitensis* Rev. 1, em países com criação extensiva e altos níveis de prevalência da brucelose ovina. Já em países livres de *B. melitensis* que tenha ocorrência da *B. ovis*, deve-se tomar cuidado com a ocorrência de reação cruzada da vacina com os testes sorológicos, dando preferência a via conjuntival para minimizar essas reações (OIE, 2015).

2.11 Medidas de controle e prevenção

O PNSCO não institui o uso de vacina para controle da doença, nem tratamento para ovinos positivos no teste sorológico, apenas marcação, isolamento e sacrifício dos animais em até 30 dias, desde que sejam mantidos separados dos outros animais. Para que a propriedade obtenha certificação, será necessária obtenção de três exames negativos consecutivos de todos os carneiros não

castrados presente no estabelecimento. Os três exames são realizados com intervalo semestral de um para o outro (BRASIL, 2004).

Uma forma de evitar a infecção, é a frequência com que é realizada a higienização as instalações e o manejo dos animais. Porém, o perfil predominante de criação de ovinos da região Norte e Nordeste do país, sistema extensivo, dificulta realização de medidas de controle, pois os animais vivem soltos e o produtor não estabelece nenhuma medida de controle reprodutivo e sanitário (SOUZA et al., 2007).

É necessária a implantação de medidas sanitárias para controlar e prevenir a infecção por *B. ovis*, não só em propriedades de criadores de ovinos para subsistência, mas também para os produtores de animais de alto valor genético, que a infecção por esta enfermidade trará grandes prejuízos (SILVA et al., 2009).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar frações antigênicas de *B. ovis* presentes em sobrenadante de cultura, inoculadas em ovinos para detectar o perfil de resposta humoral ao longo de 12 meses.

3.2 Objetivos específicos

- Inocular o antígeno por via subcutânea com a finalidade de observar a resposta humoral em ovinos;
- Acompanhar a resposta humoral ao longo de 12 meses através do ELISA indireto padronizado no Laboratório de Doenças Infecciosas.

4 Metodologia

4.1 Local do estudo e Amostras

O experimento foi desenvolvido em uma propriedade no município de Ribeira do Pombal-Bahia (BA), que tem um rebanho de ovinos estimado em 300 animais da raça Santa Inês, Dorper, e mestiços de Santa Inês e Dorper. No estudo, foram utilizados 85 ovinos desse rebanho, entre seis meses a cinco anos de idade, selecionados aleatoriamente, divididos em três grupos. Todos os animais utilizados no estudo receberam colar com numeração, para identificação e divisão dos grupos e todos passaram pelos mesmos tratamentos e manejos da propriedade, durante o período do estudo. O sistema de criação da propriedade é o semi-intensivo, utilizando no manejo reprodutivo a monta natural, onde os machos (reprodutores) convivem livremente com todos os animais do rebanho.

4.2 Produção do antígeno para inoculação

O protocolo de produção deste antígeno de *B. ovis* foi baseado no protocolo realizado segundo Zerbinati et al. (2007) e modificado para cepa de *B. ovis*. Utilizou-se uma linhagem de *B. ovis* do Laboratório de Doenças Infecciosas da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), Lauro de Freitas-Bahia. O cultivo da cepa em caldo *Brucella* foi utilizado para causar expansão em 200ml de caldo *Brucella*, colocado em estufa a 37°C, durante 15 a 30 dias. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza, aliquotado no fluxo laminar em tubos de ensaio de 10ml e centrifugado durante 30 minutos, a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e o líquido sobrenadante, que constitui o antígeno, foi recolhido e congelado em freezer à temperatura de -20°C.

4.3 Inoculação e coletas

O antígeno de *B. ovis* foi diluído em um coletor estéril, utilizando 500µl do antígeno de *B. ovis* e 35ml de glicerina líquida, homogeneizado e armazenado em temperatura de 8°C.

No “Dia Zero” (02 de outubro de 2014), a equipe de trabalho se direcionou a propriedade em Ribeira do Pombal-BA. Antes da inoculação do antígeno, coletou-se sangue dos 85 ovinos que participaram do estudo, realizando-se a punção da veia jugular, com agulha hipodérmica descartável de diâmetro 40x12mm e tubos sem anticoagulante, para armazenar o sangue coletado (Figura 01), mantendo-os à temperatura ambiente por 10 minutos para retração do coágulo (Figura 02). Após a retração do coágulo, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 8°C. Em seguida, iniciou-se a inoculação do antígeno diluído em glicerina líquida, utilizando-se seringas descartáveis e agulha com diâmetro de 30X08mm, na região do flanco do animal por via subcutânea, seguindo as seguintes doses:

Grupo 01: Foi inoculado uma dose de 0,5ml do antígeno de *B. ovis* em 31 animais.

Grupo 02: Foi inoculado 0,25ml do antígeno de *B. ovis* (metade da dose que foi utilizada no Grupo 01) em 31 animais.

Grupo 03: Foi o grupo controle, ou seja, não foi inoculado o antígeno de *B. ovis*. Neste grupo, foi inoculado, 0,5ml de solução fisiológica em 23 animais.



Figura 01. Antissepsia seguida da coleta de sangue através da punção da veia jugular, utilizando agulha hipodérmica descartável 40x12mm e tubo sem anticoagulante.



Figura 02. Tubos com sangue coletado mantidos em temperatura ambiente para retração do coágulo.

A utilização de três grupos foi necessária para avaliar se há diferença na quantidade de anticorpos produzidos entre o Grupo 01 e o Grupo 02, que foram inoculados com diferentes doses. O Grupo 03 foi o controle, ou seja, os animais passaram pelo mesmo processo dos animais dos outros dois grupos, só que ao invés de inocular o antígeno, foi inoculado apenas solução fisiológica. Durante todo

o período de manejo dos animais e inoculação do antígeno de *B. ovis*, o antígeno foi mantido sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável.

Após a inoculação, seguiu-se com as coletas, que foram realizadas as 24 horas e então aos 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, e 360 dias, totalizando 13 coletas, contando com o “Dia Zero”.

Para realização das coletas foram utilizadas as estruturas da propriedade, e os animais eram contidos na “seringa” do tronco, que é utilizada para manejo sanitário dos animais (vacinação e vermifugação) (Figura 03).



Figura 03. Realização das coletas utilizando as instalações da propriedade.

Em todas as coletas, após retração do coágulo, as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Chegando ao LDI, as amostras foram retiradas da caixa de isopor e deixadas na bancada até atingirem a temperatura ambiente de laboratório, para evitar hemólise. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, para obtenção do soro. Em seguida, as amostras foram retiradas da centrífuga e os

soros foram aliquotados em microtubos devidamente identificados com o número de cada animal e, levados para congelamento a -20°C para posteriores análises.

4.4 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISAI) com antígeno comercial

O teste ELISA indireto utilizado foi padronizado e modificado por Pimentel-Silva (2015) que utilizou o antígeno de *B. ovis* composto por proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da bactéria, amostra Reo 198, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), partida 001/14 e data de fabricação JUL/14, e Partida 002/15 e data de fabricação SET/15. Utilizou-se placas de poliestireno com 96 poços que foram sensibilizadas com o antígeno comercial, na diluição de 1:800 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após a diluição do antígeno, as placas foram sensibilizadas adicionando-se 100µl, do antígeno diluído, em cada poço da placa, colocando-a em câmara úmida e incubada “*Over night*”, 16 a 18 horas, entre a 4 e 8°C. Passado esse período, os poços foram lavados por duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS, do inglês Phosphate Buffer Solution) acrescida com Tween-20 (detergente), obtendo o PBS-T. Posteriormente, foram adicionados aos poços 200µl de uma solução de PBS-T com leite desnatado a 5%, para fazer o bloqueio de sítios livres reativos e a placa foi inoculada novamente em câmara úmida, durante duas horas à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada uma vez com PBS-T. Adicionou-se aos poços 50µl dos soros testes dos animais diluídos em solução de PBS-T e leite desnatado a 1% na diluição de 1:100 e a placa foi, novamente, incubada por uma hora a 37°C. Passado esse período, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e foi adicionado em cada poço, 50µl do conjugado anti-IgG ovina produzida em coelho, marcado com peroxidase, diluído em PBS-T na proporção de 1:10.000 e, levou-se a placa novamente para incubação por uma hora, a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada cinco vezes, adicionando-se 50µl da solução reveladora composta por 4mg de OPD (ortophenylene-diamine) diluído em 10ml de tampão citrato de pH 5,1 e 30µl de água oxigenada (H₂O₂), protegendo a placa em caixa escura, fora do contato direto com a luz, por 15 minutos. Passado esse tempo, a reação foi interrompida, adicionando-se 25µl de

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) e, levado a leitura em leitora de ELISA com filtro de 490 nm de comprimento de luz.

5 Resultados

O grupo controle (grupo 03), apresentou densidade óptica (D.O.) baixa (quando comparada com a D.O. dos grupos com produção de anticorpos) em todo o período do experimento, demonstrando que os animais não apresentavam resposta imune contra *Brucella ovis* (Figura 04). Alguns animais do grupo controle apresentam D.O. acima da encontrada no início do experimento, podendo ser considerados esses resultados como falsos positivos. No entanto, os grupos tratados (grupos 01 e 02) apresentaram D.O. baixa no início do estudo e, ao longo do tempo, demonstraram resposta imune contra ao antígeno de *Brucella ovis* inoculado.

No grupo 01, que foi utilizado 0,5ml do antígeno, após 24 horas da inoculação quatro animais já apresentaram resposta imunológica contra o antígeno inoculado, podendo ser um resultado falso positivo. Aos 60 dias, houve aumento na D.O., que foi decaindo ao longo de 120 dias. Em seguida, no dia 150 foi observado que a resposta imunológica aumentou e decaiu aos 210 dias e, logo em seguida, houve um discreto aumento na produção de anticorpos nos 270 dias após a inoculação. Após esse período, não houve resposta imune relevante e a cinética de anticorpos foi capaz de demonstrar que os animais foram responsivos ao antígeno de *B. ovis* inoculado (Figura 05).

No grupo 02, os animais receberam a dose de 0,25ml do antígeno e, observou-se que a resposta imune se iniciou a partir de 24 horas após a inoculação, decaindo bruscamente após 90 dias, tendo o decaimento total em 120 dias. Após esse período, foi observada uma discreta produção de anticorpos que manteve-se dos 120 aos 210 dias, tendo apenas um leve aumento nos 180 dias, decaindo nos 240 dias. Nos 270 dias, observou-se um pequeno aumento na produção de anticorpos, que logo decaiu ao 300 dias. Após esse período, não foi observada produção de anticorpos relevantes (Figura 06).

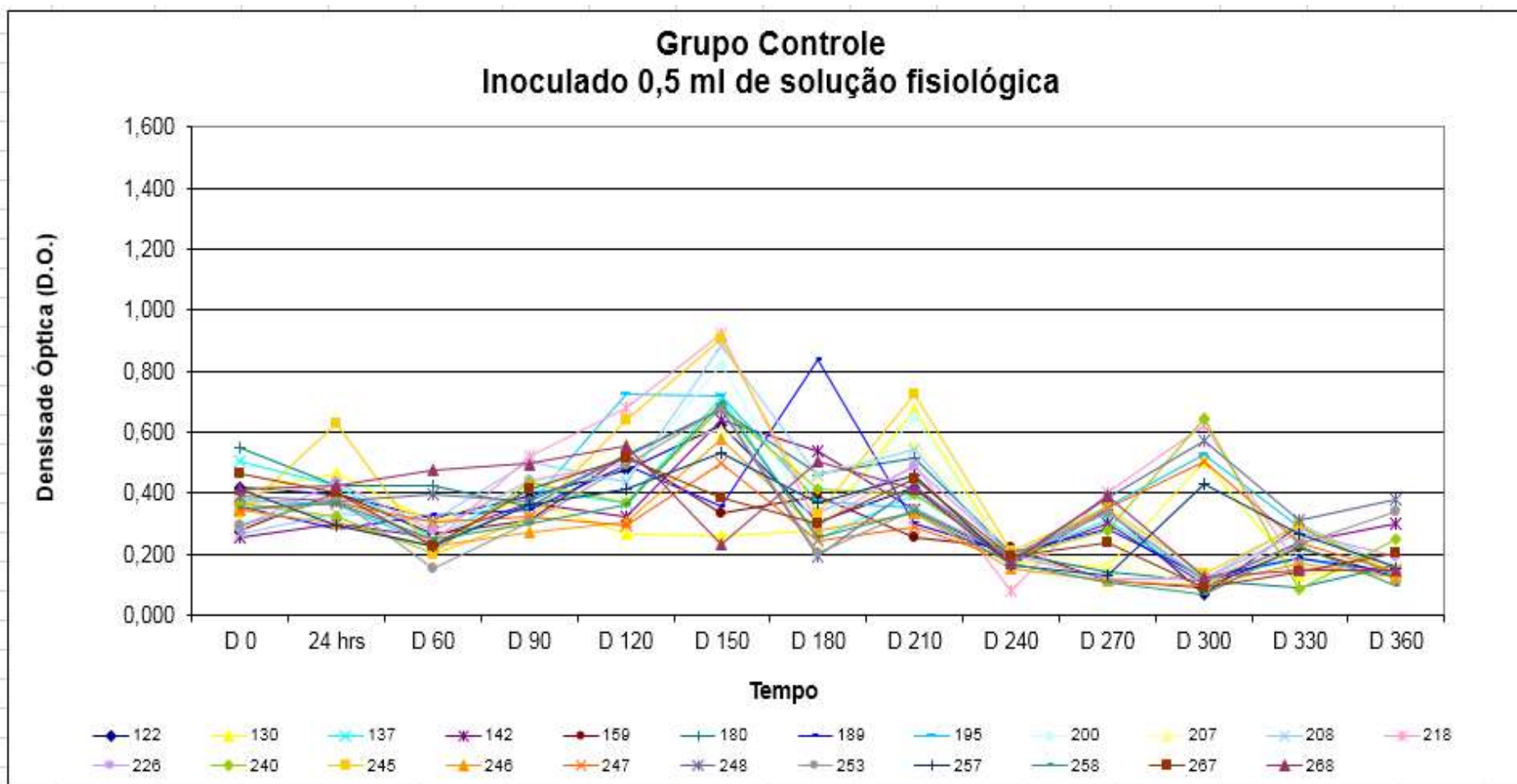


Figura 04. Resposta imune humoral de ovinos utilizados como controle, o qual receberam uma dose de 0,5ml de solução fisiológica, não havendo resposta imunológica.

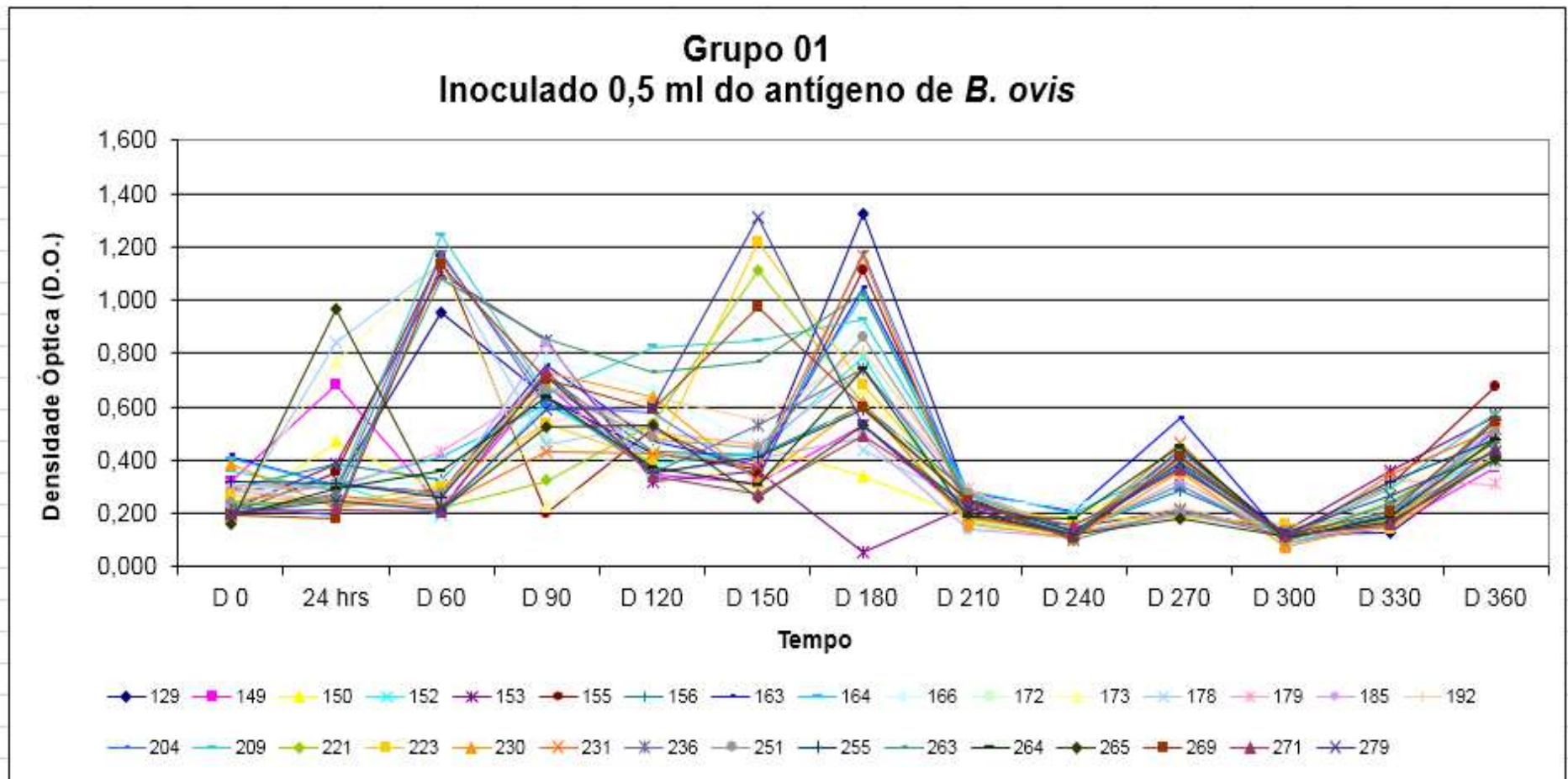


Figura 05. Demonstração ao longo de 360 dias, da resposta imune humoral de ovinos inoculados com 0,5ml de um antígenos de *Brucella ovis* diluído em glicerina líquida.

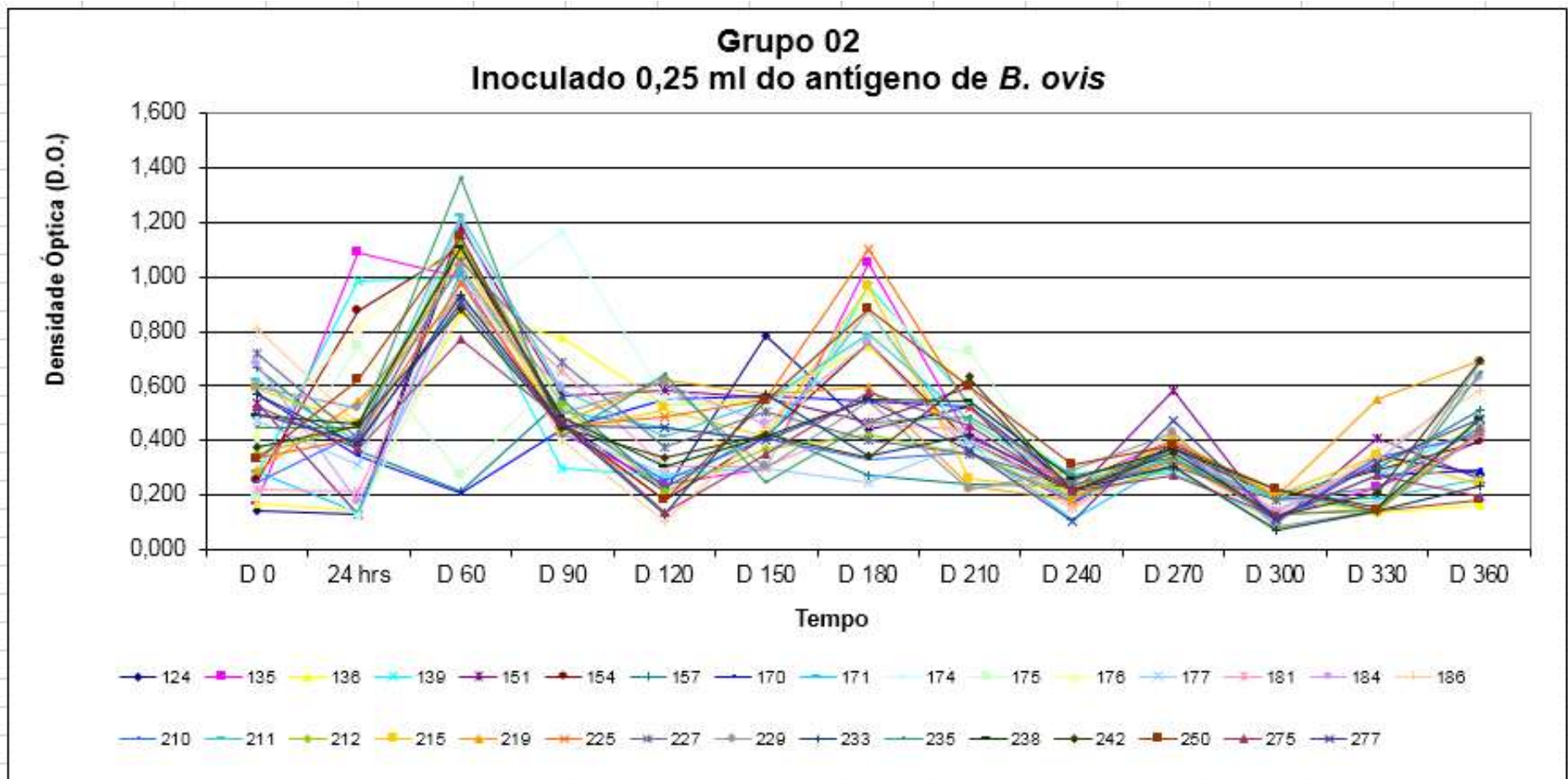


Figura 06- Resposta imune humoral de ovinos inoculados com 0,25ml de um antígenos de *Brucella ovis* diluído em glicerina líquida.

Observando a resposta dos animais do grupo 01 que recebeu 0,5ml do antígeno diluído em glicerina líquida e, o grupo 02 que recebeu 0,25ml do mesmo antígeno e adjuvante, é possível dizer que o grupo 01 demonstrou uma resposta imune melhor do que o grupo 02, ambos os grupos apresentaram resposta imune a partir da 24 horas, porém, no grupo 02 essa resposta decaiu acentuadamente aos 90 dias, sofrendo decaimento global nos 120 dias, diferente do grupo 01 que teve decaimento gradual ao longo de 120 dias. Ainda, quando o grupo 01 apresentou uma resposta imune considerável dos 150 aos 210 dias, o grupo 02 apresentou, nesse mesmo período, apenas uma discreta produção de anticorpos, tendo um pequeno pico nos 180 dias, que no grupo 01 esse pico foi mais relevante.

6 Discussão

Martins et al. (2012) avaliaram a resposta do complexo antigênico salino extraído de uma cepa de *B. ovis* encapsulados em nanopartículas e, inoculado por via conjuntival em camundongos, observaram que os animais, ao serem desafiados com a bactéria, demonstraram proteção, significativamente mais elevada do que a observada para a vacina comercial de *B. melitensis* Rev. 1, que é utilizada nos rebanhos, o que pode ser observado no presente trabalho, que frações antigênicas de *Brucella ovis* inoculadas via subcutânea em ovinos, demonstrou ser eficiente na estimulação de produção de anticorpos contra essa enfermidade.

Poeta et al. (2003), avaliando a resposta imune de ovinos com a vacinação via conjuntival com a estirpe Rev.1 de *B. melitensis*, demonstraram que a vacina estimulou o sistema imunológico, apesar de o presente estudo ter utilizado frações antigênicas de *B. ovis*, diferente da vacina utilizada pelos autores, que foi vacina viva atenuada, também observa-se nesse estudo que o antígeno avaliado foi capaz de gerar resposta imunológica. Além disso, os autores relatam que quando testados em provas sorológicas, há reação cruzada com anticorpos vacinais, o que pode ser diminuído caso a vacina seja inoculada por via conjuntival, que terá uma resposta imunológica menos severa, sendo possível observar a necessidade de desenvolvimento de uma vacina para a *B. ovis* que demonstre proteção aos animais e não interfira nos testes sorológicos.

Comparando-se com a vacina B19[®], que é uma vacina viva atenuada utilizada em bovinos fêmeas de idade entre 3 e 8 meses, que induz uma resposta imune, havendo um decréscimo rápido dos anticorpos, que após 12 meses atinge títulos inferiores a 25UI (BRASIL, 2006), mesmo não sendo uma vacina viva atenuada, foi possível observar resultados semelhantes na resposta dos ovinos inoculados com o antígeno de *B. ovis*, que houve indução da produção de anticorpos, que sofreu decaimento ao longo do tempo, tendo baixas quantidades após 12 meses da inoculação.

As variações nas respostas imunológicas observadas no presente estudo podem estar ligadas com a idade e sexo dos animais, tendo em vista que foram

utilizados animais de ambos os sexos com idades variando entre seis meses a cinco anos e, as fêmeas apresentavam-se com gestações em diferentes períodos. Golding et al. (2001) afirmam que a resposta imune do hospedeiro vai depender da idade do animal, estado imunitário e sexo, uma vez que nas fêmeas o tempo de gestação pode influenciar.

7 Conclusão

Sendo assim, foi possível observar que o antígenos de *B. ovis* inoculado em ovinos mostrou-se capaz de gerar resposta imunitária nos animais, demonstrando o caráter inovador desse estudo.

Como houve a limitação de desafiar os animais, sugere-se a realização de novos estudos que demonstrem a utilização do antígeno de *B. ovis* como vacina, avaliando-se a capacidade de prevenção da brucelose ovina comprovando através do desafio dos animais.

Referências

- ALMEIDA, M. C. de. Brucelose bovina vacinas e imunidade. Campo Grande-MS, 2008. Disponível em: <<http://qualittas.com.br/uploads/documentos/Brucelose%20Bovina%20Vascinas%20-%20Michelle%20Carmo%20de%20Almeida.PDF>>. Acesso em: 11/10/2015.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. **Paris: INRA**, p. 190, 1988.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. Las tecnicas de laboratorio en la brucellosis. **World Health Organ. Monogr. Ser.**, v.55, p.156-160, 1976.
- AMOROSO, M.G., SALZANO, C., CIOFFI, B., NAPOLETANO, M., GAROFALO, F., GUARINO, A., FUSCO, G. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. **Food Control**, 22, 1466- 1470, 2011.
- ANTUNES, J. M. A. P.; ALLEDORF, S. D.; APPOLINÁRIO, C. M.; CAGNINI, D. Q.; FIGUEIREDO, P. R.; BURATINI JÚNIOR, J.; BAÑOS, J. V.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; MEGID, J. Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro- and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. **Veterinary Microbiology**, Utrecht, v. 161, n. 3-4, p. 339-43, 2013.
- BAIGÚN, R.; CONIGLIARO, A.S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. **Veterinaria Argentina**, v.7, n. 162, p.103-107, 2000.
- BALDWIN, C.L., WINTER, A. Macrophages and Brucella. **Immunol Ser.** 60, 363-380, 1994.
- BATISTA, H. M. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B. Ocorrência de ovinos soropositivos para *Brucella ovis* nos rebanhos do estado do Ceará. In: **Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual Vale do Acaraú**, Sobral-CE, 2011. [Anais...]. Sobral: UVA, 2011. 8 f.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOVAN, B.; OLANDER, H.; KENNEDY, P. Epididymitis in ram. Studies in pathogenesis. **Cornell Vet.**, v. 54, n.1, p.27-41, 1964.
- BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). Animal Brucellosis. **Boca Raton: CRC Press**, p.351-378, 1990.
- BLASCO, J. M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. **Small Ruminant Research**. v.62, p. 33–37, 2006.

BLASCO, J.M.; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. **Veterinary Clinical Food Animal**. n.27, p.95-104, 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária Municipal**. Brasília, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 20 DE MAIO DE 2003. **Aprovar o Regulamento Técnico para Produção, Controle e Emprego de Vacinas Autógenas**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministerio da Agricultura Pecuaria e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. 184p, 2006.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Vet Microbiol**, 90, 435-446, 2002.

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.

BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (n. sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal for Hygiene**, v.54, p.351-364, 1956.

BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N.; DENIS, M.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.151, p.14-22, 2011.

BULGIN, M.S; ANDERSON B.C., Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. **JAVMA**, v.182, p. 372-374, 1983.

BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. **JAVMA.**, v.196, n.2, p.313-315, 1990.

BULGIN, M.S. Epididymitis in rams and lambs. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.6, p. 683-690, 1990.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 102 de 17 de dezembro de 2004. Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite

Ovina_ *Brucella ovis*. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de dezembro 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislação>>. Acesso em: 15/06/2015.

CARO-HERNÁNDEZ, P.; FENÁNDEZ-LAGO, L.; MIGUEL, M. J.; MARTÍN-MARTÍN, A. I.; CLOECKART, A.; GRILLÓ, M. J.; VISCAÍNO, N. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 8, p. 4050-4061, 2007.

CARON, E., LIAUTARD, J.P., KOHLER, S. Differentiated u937 cells exhibit increased bactericidal activity upon Ips activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. **J Luk Biol.** 56, 174-181, 1994.

CASTANEDA-ROLDAN, E. I.; AVELINO-FLORES, F.; DALL'AGNOL, M.; FREER, E.; CEDILLO, L.; DORNAND, J.; GIRON, J. A. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. **Cellular Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 5, p. 435-445, 2004.

CFSPH - CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. 2007. Brucellosis. Disponível em: <<http://www.cfspth.iastate.edu/IICAB/>>. Acesso em: 20/09/2015.

COELHO, A.; DÍEZ, J. G.; COELHO, A. C. Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. **Revista electrónica de Veterinaria** - ISSN 1695-7504, Volumen 15 Nº 05, 2014.

COLETO, Z. F. et al. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos no estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 27, p. 551-553, 2003.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerg Infect Dis.** 3, 213-221, 1997.

CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J A REVIEW Brucellosis – new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology** v. 98, p.1270–1281, 2005.

DANTAS, T. V. M. Desenvolvimento e padronização de ELISA Indireto para diagnóstico de Maedi-Visna Vírus em ovinos. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/tania_dantas.pdf>. Acesso em 03/11/2015.

ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epidemitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.31, n.1, p.5-17, 1999.

ESTEIN S.M., BALDI P.C. & BOWDEN R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 14, 407-411, 2002.

FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; TRAVASSOS DIAS, I.; MARIANO, I.; BELO, A.; ROLÃO PRETO, I.; MATEIGAS, A.; PINA FONSECA, A.; CORREA DE SA, M.I. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme- Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Veterinary Research**, v. 34, p. 297-305, 2003.

FLORES, E.F. Virologia Veterinária. **Editora UFSM**, Santa Maria, 888p, 2007.

FOWLER, V. L.; BASHIRUDDIN, J. B.; MAREE, F. F. MUTOWEMBWA, P.; BANKOWSKI, B.; GIBSON, D.; COX, S.; KNOWLES, N.; BARNETT, P. V Foot-and-mouth disease marker vaccine: Cattle protection with a partial VP1 G–H loop deleted virus antigen, **Vaccine**, Kidlington: Elsevier, v.29, p.8405-8411, 2011.

GIL-TURNES, C. Brucelose ovina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. 2.ed. **Varela**, São Paulo, Cap.3, p.197-204. 2001.

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

GOLDING, B., SCOTT DOROTHY, E., SCHARF, O., HUANG, L. Y., ZAITSEVA, M., LAPHAM, C. H., ELLER, N., GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection**. 3, 43–48, 2001.

GOMES, M.J.P. Gênero *Brucella* spp. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 29 de outubro de 2015.

GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN. M.; BLASCO, J.M. Experimental *Brucella ovis* infection in preagnant ewes. **Vet. Rec.**, v. 144, p. 555-558, 1999.

GREVE, I. C.; SILVA, M. C. A.; TRINDADE, S.; SILVA, D.; MASCARENHAS, M. T.; BAHIA-CERQUEIRA, B. Utilização de um antígeno comercial para o teste ELISA indireto na detecção de anticorpos contra a brucelose ovina. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 379-386, out./dez. 2011.

GUPTA, V.K., SHIVASHARANAPPA, N., KUMAR, V., KUMAR, A. Diagnostic evaluation of serological assays and different gene based PCR for detection of *Brucella melitensis* in goat. **Small Rum Res** 117, 94-102, 2012.

HARTLEY, W.J. The pathology of *Brucella ovis* infection in the pregnant ewe. **New Zealand Veterinary Journal**, v.9, n.6, p.115-120, 1961.

HOMSE, A. C.; CASARO, A. P.; CAMPERO, C. M. Infertilidad em ovelas por *B. ovis*. **Veterinaria Argentina**, v.12, n.114, p.243-249, 1995.

ISHIZUKA, M.M.; LEITE, L.O.; DINIZ, O. Epidemiologia e profilaxia da epididimite infecciosa ovina (Brucelose Ovina), disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=22&ar=1&nm=Sanidade%20Animal>. Acesso em: 29 de novembro de 2014.

JACQUES, I., OLIVIER-BERNARDIN, V., DUBRAY, G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Vet Microbiol**, 64, 61-73, 1998.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.4, p.709-726, 2007.

KARIMINIA, A., KAVOOSY, G., KHATAMI, S., ZOWGHI, E., ARDESTANI, S.K. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different *Brucella* strains. **Com Immunol Microbiol Infect Dis**. 25, 85-93, 2002.

LAPAQUE, N.; FORQUET, F.; DE CHASTELLIER, C. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. **Cellular Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2, p. 197-206, 2006.

LIRA, N.S.C.; MEGID, J. Patogenia da Brucelose Ovina. **Veterinária e Zootecnia**, p. 280-289, v. 16, n. 2, Jun., 2009.

LÓPEZ, G., ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; LUCERO, N.E. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n.1-3, p.232-238, 2006.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.2/3, p.75-79, 1996.

MANAZZA, J.; SPATH, E.; PAOLICCHI, F. Brucelosis ovina. **Revista Del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires**, v.11, n.35, p.42-44, 2006.

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCÉS, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J.M.; MARIN, C.M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Evaluation of a PCR test for diagnosis of

Brucella ovis infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.65-72, 2003.

MARCO, J.; GONZÁLEZ, L.; CUERVO, L.A.; HEREDIA, F.B.; BARBERÁN, M.; MARÍN, C.; BLASCO, J.M. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. **Vet. Rec.**, v.135, p. 254-256, 1994.

MARÍN C.M., BARBERÁN M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & BLASCO J.M. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. **Res. Vet. Sci.** 48, 209–215, 1990.

MARINHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.2/3, p.45-48, 1996.

MARTÍN-MARTÍN, A.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; ORDUNA, A.; VIZCAÍNO, N.; FERNANDEZ-LAGO, L. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. **Microbes and Infection**, Merced, v. 10, n. 6, p. 706-710, 2008.

MARTINS, R. da C.; GAMAZO, C.; SÁNCHEZ-MARTINÉZ, M.; BARBERÁN, M.; PEÑUELAS, I.; IRACHE, J. M. Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 162, 553–560, 2012.

MEDEIROS, J.M.; TABOSA, I.M.; SIMÕES, S.V.D.; NÓBREGA JUNIOR, J.E.; VASCONCELOS, J.S.; RIET-CORREA, F. Mortalidade perinatal em cabritos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.201-206, 2005.

MEYER, M.E. *Brucella ovis*, In: _ Handbuch der bakteriellen infektionen bei tiernen. **Jena: Blobel and Scheleba**, Chap. 6, 1982.

MIRNEJAD, R., MOHAMADI, M., PIRANFAR, V., MORTAZAVI, SM., KACHUEI, R. A duplex PCR for rapid and simultaneous detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Asian Pac J Trop Dis**, 6, 453-456, 2013.

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

MUÑOZ P., DE MIGUEL M.J., GRILLÓ M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M. & BLASCO J.M. Immunopathological responses and kinetics of *B. melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. **Vaccine**, 26, 2562–2569, 2008.

MYERS, D. M.; SINIUK, A. A. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method for the diagnosis of RAM epididymitis. **Applied Microbiology**, v. 19, p. 335- 337, 1970.

NÁREZ, G.M.; APARICIO, E.D.; ALVAREZ, J.F.M.; ROMERO, F.A.; GÜEMES, F.S. Epididymitis ovina: estudios bacteriológico y serológico. **Vet. Mex.**, v.30, n.4, p.329-336, 1999.

NIELSEN K., SMITH P., CONDE S., DRAGHI de BENITEZ G., GALL D., HALBERT G., KENNY K., MASSENGILL C., MUENKS Q., ROJAS X, PEREZ B., SAMARTINO L., SILVA P., TOLLERSRUD T. & JOLLEY M. Rough Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. **J. Immunoassay Immunochem.**, 25, 171–182, 2004.

NOGUEIRA, A. H. C.; FERRARI, C. I. L.; CURCI, V. C. L. M. Brucelose ovina (*Brucella ovis*). **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 3, n. 2, 2006.

NOLTE, O.; MORSCHER, J.; WEISS, H-E.; SONNTAG, H-G.; Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes*. **Vaccine**. Kidlington: Elsevier, v.19, p.3146-3153, 2001.

NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C.; SILVA JUNIOR, F.F.; VELOSO, C.S. Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA no diagnóstico de Brucelose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.1-5, 2004.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf. Acesso em 18 de setembro de 2015.

PAOLICCHI, F. A.; CASARO, P.A.; GIMENO, E.J.; KORTEBANI, L.G.; MAZZOLLI, A.B. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Ruminant Research**, v.36, p.7-15, 2000.

PAOLICCHI, F. A. Epididymitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. **Rev. Med. Vet.**, v.82, n.2, p. 86-88, 2001.

PAOLICCHI, F. A.; TERZOLO, H.R.; MALENA, R.C.; MORSELLA, C. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.23, p.155-159, 1991.

PAULIN L. M.; FERREIRA NETO, J. S. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. **Funep**, Jaboticabal. 154p. 2003.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. Disponível em: <<http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>>. Acesso em 09 de Novembro de 2015.

PIMENTEL-SILVA, B. Comunicação pessoal. 2015.

POETA, P. et al . Resposta imunitária à vacinação conjuntival com a estirpe Rev.1 de *Brucella melitensis* em ovinos e caprinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 55, n. 2, p. 220-222, abr. 2003.

PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **BMC Vet. Res.**, 8:68, 2012.

PROBERT, W. S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N.Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1290-1293, 2004.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Gênero *Brucella*. In: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. **Artmed**. Porto Alegre, p. 166-171, 2005.

QUISPE, R. Ch.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. **Rev. Invest. Vet. Peru**, v.13, n.1, p.61-66, 2002.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Brucelose causada pela *Brucella ovis*. In: Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, 9ed. p.791-794, 2002.

RAMOS, A.A.; MIES FILHO, A.; SCHENCK, J.A.P.; VASCONCELLOS, L.D.; PRADO, O.T.G.; FERNANDES, J.C.T.; BLOBEL, H. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.211-213, 1966.

REDKAR, R., ROSE, S., BRICKER, B., DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, v. 15, n. 1, p. 43-52, 2001.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stages. **N. Z. Vet. J.**, v. 50, n.1, p.19-22, 2002.

ROTH, J. A. Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. **Procedia in Vaccinology**, v.5, p.127-136, 2011.

SARI, R. S.; Desenvolvimento de vacina de liberção controlada contra *C. botulinum* tipo C e tipo D utilizando quitosana. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias**, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 142P, 2010.

SILVA, J. B. A.; CARNEIRO, F. M. F.; TEIXEIRA, F. M. S.; SILVA, J. S. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Ciência Animal**. v. 13, p.51-4, 2003.

SILVA, N. S.; BARROS, I. N.; DASSO, M. G.; ALMEIDA, M. G. Á. R.; LABORDA, S. S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; MOREIRA, E. L. T.; LIMA-SILVA, A. E.; OLIVEIRA, E. M. D. Detecção de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos do estado da Bahia. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 10, n. 4, p. 852-859, 2009.

SINGER, R. S.; FINCH, R.; WEGENER, H. C.; BYWATER, R.; WALTERS, J.; LIPSITCH, M. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**. 3:47-51, 2003.

SOUZA, T. S. et al. Estudo sorológico da Maedi-Visna pelo método da imunodifusão em gel de ágar em rebanhos ovinos de Juazeiro, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 276-282, 2007.

SOUZA, T. S.; COSTA, J. N.; MARTINEZ, P. M.; LIMA, C. C. V.; ARAÚJO, B. R.; COSTA NETO, A. O.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALMEIDA, M. G. A. R.; PINHEIRO, R. R. Inquérito soro-epidemiológico de *Brucella ovis* em rebanhos ovinos no semiárido baiano. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.2, p.277-281, 2012.

TAMAYO, R.; VALENTIN, H.; SCHOEBITZ R. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. **Arch. Med. Vet.** , v.21, n. 1, p.22-28, 1989.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F. *Brucella* in pathogenesis of bacterial infections in animals. **Iowa State University Press**, chap. 20, 1986.

TIZARD, I.R. Veterinary Immunology – An Introduction. W.B. **Saunders Company**. USA, pp. 121-140, 1996.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZÁLES, D.; ZÄHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella abortus* and Its Closest Phylogenetic Relative, *Ochrobactrum spp.*, Differ in Outer Membrane Permeability and Cationic Peptide Resistance. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3210–3218, 2000.

VISCAÍNO, N.; KITTELBERGER, R.; CLOECKAERT, A.; MARÍN, C. M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 11, p. 7020-7028, 2001.

WALKER, R.L. *Brucella*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. Microbiologia Veterinária, **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.185-191, 2003.

WALKER, R.L. ; LEAMASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N.; BIRBERSTEIN E.L., A. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.188, n.4, p. 393-396, 1986.

WYCKOFF, J.H., Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. **Vet Microbiol.** 90, 395-415, 2002.

XAVIER, M. N.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A.; PAIXÃO, T. A.; MOUSTACAS V. S.; CUSTÓDIO, A.; CARVALHO-JÚNIOR, A.; SANTANNA, F. M.; ROBLES, C. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LAGE, A. P.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, Utrecht, v. 145, n. 1-2, p. 158-64, 2010.

YOUNG, E.J. *BRUCELLA SPECIES*. IN: MANDELL, G.L., BENNET, J.E., DOLIN, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. **Churchill Livingstone**, New York, pp. 2053-2060, 1995.

ZAITSEVA, M.B., GOLDING, H., BETTS, M., YAMAUCHI, A., BLOOM, E.T., BUTLER, L.E., STEVAN, L., GOLDING, B. Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heatinactivated *Brucella abortus*. **Infect Immun.** 63, 2720-2728, 1995.

ZHAN, Y., CHEERS, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. **Infect Immun**, 63, 1387-1390, 1995.

ZHAN, Y., LIU, Z., CHEERS, C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. **Infect Immun**, 64, 2782-2786, 1996.

ZERBINATI, J.; GREVE, I. C.; LEAL, R. F.; AMORIN, L. M. P. V. de; SILVA, D. L. da; VIEGAS, S. R. A. de A.; PEIXOTO, A. C.; CARMINATI, R.; BAHIA-CERQUEIRA, R. Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. **Rev. Acad.**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 285-293, jul./set. 2007.