

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

**BIANCA PIMENTEL SILVA**

**AVALIAÇÃO DE UM ANTÍGENO COMERCIAL DE *BRUCELLA OVIS***  
**NA PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O**  
**DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE OVINA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JANEIRO-2016**

**BIANCA PIMENTEL SILVA**

**AVALIAÇÃO DE UM ANTÍGENO COMERCIAL DE *BRUCELLA OVIS*  
NA PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O  
DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE OVINA**

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

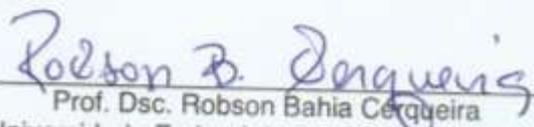
|  |
|--|
|  |
|--|

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

BIANCA PIMENTEL SILVA

AVALIAÇÃO DE UM ANTÍGENO COMERCIAL DE BRUCELLA OVIS NA  
PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA  
BRUCELOSE OVINA



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



Msc. Clarissa Vitória Silva Lopes  
Mestrado Ciência Animal nos Trópicos / UFBA



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

Cruz das Almas, 04 de janeiro de 2016.

Essa dissertação é dedicada a meus pais, Valdomiro de Jesus Silva e Rosenilda Miranda Pimentel, que sempre me apoiaram, encorajaram e incentivaram as minhas conquistas.

## **Agradecimentos**

A Deus pela vida, força, fé, orientação e proteção.

À minha mãezinha do céu que sempre me deu forças para não desistir, e me fez confiar que eu sou capaz.

Aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional, incentivo, e por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida, me guiando quando os passos eram confusos.

Ao meu namorado, Lourival Júnior, que além de tudo é meu melhor amigo, por me sustentar quando muitas vezes pensei que fracassaria, e pelo amor a mim dedicado.

Aos meus avós pela simplicidade do existir e referência de vida.

À melhor amiga que poderia ter, Mariana Oliveira, pela amizade, carinho, incentivo, que mesmo com toda a distância nunca me fez desacreditar que a amizade verdadeira supera qualquer obstáculo.

Ao meu orientador, professor Robson Bahia Cerqueira, por todos os ensinamentos e por ter me acolhido.

A todos os professores que fizeram parte dessa jornada, obrigada pelos conhecimentos transmitidos e dedicação, principalmente aqueles que não me deixaram desacreditar que o mundo acadêmico jamais será superior aos valores morais.

Ao grupo de Pesquisa em Infectologia e Saúde Veterinária, por todos os ensinamentos, companheirismo e amizade verdadeira.

Aos amigos que a UFRB me deu, foram mais que colegas, foram a minha família nessa caminhada.

Aos amigos, mais distantes, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Aos funcionários, que também foram amigos, Sr. Hélio, Wilson, Roque, Ana Paula e, Carmo, pela ajuda e carinho.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma maneira, fizeram parte dessa jornada.

**O pensamento escolhe. A ação realiza.  
O homem conduz o barco da vida com  
os remos do desejo e a vida conduz o  
homem ao porto que ele aspira a chegar.  
Eis porque, segundo as leis que nos  
regem, “a cada um será dado segundo  
suas próprias obras”.**

**Emmanuel**

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumo.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1 Introdução .....</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>2 Revisão de literatura .....</b>                         | <b>14</b> |
| <b>2.1 Agente etiológico .....</b>                           | <b>14</b> |
| <b>2.2 Características de crescimento e morfologia .....</b> | <b>15</b> |
| <b>2.3 Características antigênicas .....</b>                 | <b>15</b> |
| <b>2.4 Reservatório.....</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>2.5 Epidemiologia.....</b>                                | <b>17</b> |
| <b>2.6 Transmissibilidade.....</b>                           | <b>18</b> |
| <b>2.7 Patogênese e sinais clínicos.....</b>                 | <b>19</b> |
| <b>2.8 Diagnóstico.....</b>                                  | <b>21</b> |
| <b>2.8.1 Diagnóstico Clínico.....</b>                        | <b>21</b> |
| <b>2.8.2 Diagnóstico Laboratorial.....</b>                   | <b>22</b> |
| <b>2.8.2.1 Isolamento e Identificação.....</b>               | <b>22</b> |
| <b>2.8.2.2 Sorologia.....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>2.8.2.2.1 Imunodifusão em gel de agarose (IDGA) .....</b> | <b>24</b> |
| <b>2.8.2.2.2 Fixação de complemento (FC) .....</b>           | <b>25</b> |
| <b>2.8.2.2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....</b>         | <b>25</b> |
| <b>2.8.2.3 Técnicas moleculares (PCR).....</b>               | <b>26</b> |
| <b>2.9 Controle e prevenção.....</b>                         | <b>28</b> |
| <b>3 Objetivo.....</b>                                       | <b>30</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>                               | <b>30</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos .....</b>                       | <b>30</b> |
| <b>4 Metodologia.....</b>                                    | <b>31</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1 Amostras .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.2 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI).....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4.2.1 Diluição dos antígenos .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.2.2 Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto.....</b>                             | <b>32</b> |
| <b>4.2.3 Estudo Estatístico.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.2.3.1 Cálculo do ponto de corte - “ cut-off ”.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.2.3.2 Cálculo de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo. ....</b> | <b>33</b> |
| <b>5 Resultados.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>6 Discussão.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>7 Conclusão .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>Perspectiva .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>Referências .....</b>  | <b>44</b> |

## Resumo

A infecção por *Brucella ovis* é uma das principais causas de perdas econômicas para a produção de ovinos no Brasil, tendo em vista que em carneiros ocasiona epididimite e esterilidade e em ovelhas pode ocasionar placentite. Esse agente bacteriano interfere ainda na nutrição fetal, e provoca o nascimento de cordeiros fracos e com baixo peso, além de poder causar a mortalidade perinatal. O diagnóstico clínico desta enfermidade é dificultoso, e os testes sorológicos mais utilizados para detecção de anticorpos contra *B. ovis* são IDGA, RFC e ELISA. Tendo em vista a necessidade de um teste eficiente para o diagnóstico da brucelose ovina, objetivou-se padronizar o ensaio imunoenzimático ELISA indireto utilizando um antígeno comercial de *B. ovis*. Foi utilizado o antígeno comercial do Kit para diagnóstico de *Brucella ovis* (Imunodifusão em Gel de Ágar) do Laboratório TECPAR, que consiste de proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da bactéria, amostra Reo 198 e, um antígeno de *Brucella canis* para comparar com os resultados do antígeno comercial. Para escolha da melhor diluição a ser utilizada do antígeno comercial, utilizou-se proporções 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800. A diluição do antígeno de *B. canis* utilizada foi 1:200. Escolhendo a melhor diluição, foram testadas 40 amostras positivas sendo 3 delas cedidas por uma pesquisadora, comprovadamente positivas pelo IDGA, e o restante obtidas através da diluição dos controle positivos do kit comercial para diagnóstico de brucelose ovina do laboratório TECPAR, partida 001/14 fabricação JUL/14 e, partida 002/15 fabricação SET/15. Todas as amostras positivas passaram pelas seguintes diluições: Antígeno puro, diluições seriadas de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 e, 40 amostras comprovadamente negativas no teste Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), cedidas por a mesma pesquisadora. O protocolo utilizado no ELISA indireto foi descrito anteriormente na literatura. Dos resultados encontrados, o teste ELISA indireto demonstrou 12,5% e 17,5% de sensibilidade, utilizando antígeno comercial de *B. ovis* e de *B. canis*, respectivamente. Já a especificidade do ELISA indireto utilizando antígeno de *B. canis* foi de 100% e de *B. ovis* foi de 92,5%. Portanto, foi possível observar a capacidade do ELISA indireto utilizando antígeno comercial de *Brucella ovis* e antígeno de *Brucella canis*, observou-se que esse último obteve melhor desempenho como relação à sensibilidade e especificidade, no entanto, a indicação de realizar esse teste utilizando antígeno de *B. ovis* é mais recomendado por conta da especificidade antigênica.

**Palavras chave:** Brucelose ovina, diagnóstico, ELISA.

## Abstract

*Brucella ovis* infection is a major cause of economic losses to sheep production in the country, considering that in sheep causes epididymitis and infertility in sheep and can cause placentitis. This bacterial agent interferes with fetal nutrition, and causes the birth of weak lambs and underweight, and can cause perinatal mortality. The clinical diagnosis of this disease is difficult, and the serological tests that are most commonly used to detect antibodies against *B. ovis* are AGID, RFC and ELISA. In view of the need for an efficient test for the diagnosis of ovine brucellosis, this study aimed to standardize enzyme immunoassay using a commercial ELISA antigen of *B. ovis*. We used the commercial antigen of Kit for the diagnosis of *Brucella ovis* (agar gel immunodiffusion) of TECPAR Laboratory, consisting of soluble proteins and lipopolysaccharides extracted from bacteria, Reo 198 sample and, a *Brucella canis* antigen to compare the results with the commercial antigen. To choose the best dilution for use of commercial antigen, it was diluted in the proportions: 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 and 1:800. The dilution of *B. canis* antigen used was 1: 200 .Choosing the best dilution, 40 positive samples were tested, of which 3 were given by a researcher, proven positive by the IDGA test, and the remainder obtained by dilution of positive control of the commercial kit for the diagnosis of ovine brucellosis TECPAR the laboratory, starting 001/14 and manufacturing JUL/14, and starting 002/15 and manufacturing SET/15. All positive samples passed the following dilutions: Pure antigen, serial dilutions of 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200 and, 40 proved negative samples in immunodiffusion test in agarose gel (IDGA). The protocol for ELISA is described previously in the literature. From these results, the indirect ELISA test showed 12.5 % and 17.5 % sensitivity, using commercial antigen of *B. ovis* and *B. canis*, respectively. Specificity ELISA 's using *B. canis* antigen was 100 % and *Brucella ovis* was 92.5 %. So it was possible to observe the indirect ELISA capacity using commercial antigen *Brucella ovis* and antigen *Brucella canis*, it was found that the latter performed better as compared to the sensitivity and specificity, however, the indication to perform this test using antigen *B. ovis* is most recommended because of the antigenic specificity.

**Key words:** ovine brucellosis, diagnosis, ELISA.

## 1 Introdução

A brucelose ovina, também conhecida como epididimite dos carneiros, é uma doença infectocontagiosa, de caráter crônico, que afeta os ovinos provocando distúrbios de ordem reprodutiva. Tem como agente etiológico a *Brucella ovis*, que provoca abortos e placentite nas fêmeas, morte perinatal ou nascimento de cordeiros fracos, além de causar, nos machos, alterações testiculares, epididimite, normalmente unilateral, e até mesmo atrofia testicular e baixa fertilidade (EMBRAPA, 2006).

O número de ovinos registrados no Brasil, em 2013, foi de 17,291 milhões de cabeças, o que representa aumento de 3,0% em relação ao efetivo de 2012. Em termos de participação regional, 56,5% dos animais estão na Região Nordeste, tendo como finalidade principal da criação, a produção de carne, além de leite e pele. O efetivo de ovinos que encontrava-se localizado na Bahia é de 16,9%, o qual teve aumento estipulado em 4,1% entre os anos de 2012 a 2013, gerando um crescimento de 4,8% na Região Nordeste (BRASIL, 2013).

Tendo em vista o aumento da criação de ovinos, essa enfermidade apresenta considerável importância sob o ponto de vista econômico, pois pode estar presente nos rebanhos de maneira silenciosa e provocando prejuízos para a produção de lã, carne e leite (MINAS, 2006). Como trata-se de uma doença que interfere no sistema reprodutor dos animais, o baixo rendimento da fertilidade dos carneiros torna-se um grande problema, sendo necessário o descarte e substituição, recorrentes, dos reprodutores. Além disso, a taxa de prenhez e parição diminuem (BAIGUN *et al.*, 2000).

A principal forma de transmissão, da *Brucella ovis*, é a venérea passiva, durante a monta natural, em que machos sadios se infectam ao cobrir ovelhas, que já foram cobertas por carneiros infectados. A transmissão pode ocorrer também de carneiro para carneiro, quando os machos dominantes cobrem os dominados e, transmitem o micro-organismo através da mucosa retal ou através da lambedura do prepúcio, e ainda indiretamente através da mucosa nasal e palpebral, através de ejaculações. As fêmeas podem eliminar o agente pelas descargas vaginais ou pelo leite, e através de secreções uterinas após o aborto (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

O diagnóstico realizado através de exame clínico ocorre através de palpação do epidídimo, que possui valor limitado, pois há animais que podem estar infectados no rebanho, mas serem assintomáticos, exame bacteriológico seminal, e métodos de diagnóstico indireto, que são muito utilizados, fundamentados em testes sorológicos, como imunodifusão em gel de ágar (IDGA), reação de fixação de complemento (RFC), ensaio imunoenzimático indireto (ELISAi) (NIELSEN *et al.*, 2008). O IDGA e a FC apresentam sensibilidade semelhantes, além de simples execução, e são técnicas preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo as normas contidas no projeto de Instrução Normativa que institui o Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

A dificuldade em ter um diagnóstico sorológico com boa especificidade e sensibilidade faz com que o diagnóstico para brucelose ovina seja sempre realizado com aplicação de duas ou mais técnicas para um resultado conclusivo, o que às vezes pode ser muito oneroso e demorado (NOZAKI *et al.*, 2004). O ELISA indireto é um teste que apresenta alta sensibilidade e alta especificidade, sendo capaz de discriminar animais reagentes e não reagentes (PINHEIRO JUNIOR *et al.*, 2009).

O diagnóstico clínico não é indicado, pois outros micro-organismos também podem provocar epididimite palpável e nem todos os carneiros infectados com *Brucella ovis* desenvolvem esse sinal clínico (COLETO *et al.*, 2003). Logo, faz-se importante padronização de uma técnica para diagnóstico, como o Ensaio Imunoenzimático Indireto, para obter-se testes confiáveis, rápidos e eficazes com bom desempenho da sensibilidade e especificidade para realização de diagnóstico seguro, contribuindo para traçar medidas que visam o controle e a prevenção mais eficientes.

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 Agente etiológico

A brucelose é uma enfermidade de caráter infeccioso causado por bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria*, à subdivisão alpha-2 da classe *Proteobacteria alfa*, Ordem *Rhizobiales*, da família *Brucellaceae*, do gênero *Brucella* (MORENO et al., 2002; QUINN et al., 2005) que inclui as espécies: *B. melitensis*; *B. abortus*; *B. suis*; *B. ovis*; *B. neotomae*; *B. canis*; *B. ceti* sp. nov.; *B. pinnipedialis* sp. nov.; *B. microti* sp. nov.; *B. inopinata* sp. nov. (ICSP, 2013).

As bactérias desse gênero são gram-negativas, cocobacilos, parasitas intracelulares facultativos, não são formadores de esporos, não são encapsuladas, e imóveis (GUL; KHAN, 2007). Não há especificidade quanto ao hospedeiro que infectam, no entanto existe uma predileção por determinada espécie animal. Assim, a *B. abortus* acomete preferencialmente bovinos, a *B. suis* suínos, a *B. melitensis* caprinos, a *B. ovis* ovinos e a *B. canis* canídeos (BRASIL, 2006).

As colônias de cultivo primário apresentam aspecto que oriunda a classificação das espécies em lisas, como *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. neotomae*, *B. suis*, ou em rugosas como *B. ovis* e *B. canis* (CASTRO; GONZALES; PRAT, 2005). Essa classificação tem como base a composição bioquímica que os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana possuem, estando relacionados diretamente à capacidade de virulência das espécies, sendo o principal antígeno de superfície de grande parte das bactérias Gram-negativas. 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 (MARÍN et al., 1989). O LPS da cepa rugosa (LPS-R) é semelhante ao das lisas, exceto pela ausência da cadeia O (BLASCO, 1990; CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

## 2.2 Características de crescimento e morfologia

A *Brucella ovis* é uma bactéria Gram-negativa, cocobacilo imóvel e não flagelada, de vida intracelular facultativa, não capsuladas, não esporuladas, possui tamanho de 0,5 a 0,7 de diâmetro, e 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, não formam endosporos e não possuem coloração bipolar (CORBEL et al., 1978, BURGESS, 1982). Possui arranjos individuais, aos pares, cadeias curtas ou mesmo em pequenos grupos. Seu crescimento ocorre em meios alcalinos como, Trypticase Soy Agar, Ágar Sangue e Ágar Columbia, enriquecidos com 5 % a 10 % de sangue ou pode ser seletivamente isolada no meio modificado de Thayer-Martim (BROWN et al., 1973; ALTON et al., 1976). Requerem uma atmosfera de 10 % a 20 % de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) no cultivo primário, mas a cepa pode ser isolada com  $\text{CO}_2$  independente. Após três a cinco dias de incubação com temperatura de 34°C a 37°C, as colônias tornam-se visíveis apresentando-se pequenas, circulares, com bordos regulares, opacas de cor, podendo variar do branco ao marrom (MEYER, 1982; ALTON et al., 1988).

Possuem sistema citocromo, e tem como acceptor final de elétrons o oxigênio ou nitrato, sendo assim nitrato redutase é produzida. As colônias, em ágar dextrose ou outro meio sem sangue irão apresentar-se transparentes, elevadas, convexas com bordos inteiros, lisos, além de superfície brilhante. Possuem coloração de mel, quando iluminadas (GOMES, 2007; ROBLES, 1998). A sobrevivência desses patógenos, na ausência de parasitismo, irá depender das condições ambientais (LAGE et al., 2008). Sendo assim, *Brucella* spp. podem possuir resistência no ambiente durante longos períodos, principalmente quando algumas condições como, pH, umidade e temperatura apresentam-se favoráveis (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

## 2.3 Características antigênicas

A *Brucella* spp. é composta por uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa (ME), a qual é constituída por lipossacarídeos, que é caracterizado como o principal antígeno de superfície na maior parte das bactérias Gram-negativas, e possui também várias outras proteínas

principais. A virulência da *Brucella* spp. possui relação direta com a composição biológica e química dos lipopolissacarídeos que constituem a membrana. Logo, a *Brucella ovis* é classificada, antígenicamente, como rugosa, isso por conta da sua constituição química da parede celular, sendo, então, não virulenta aos humanos. A superfície das bactérias desse gênero possui variação conforme a fase em que se encontra que pode ser lisa ou rugosa. Os lipopolissacarídeos das cepas rugosas (LPS-R) são formados por lipídeos A ou M, oligossacarídeo central e ausência da cadeia polissacarídica mais exposta, que é denominada como cadeia O (BLASCO 1990; MORIYON, 1988). Portanto, a cadeia de polissacarídeo O não recobre outros antígenos da superfície, deixando então *outer membrane proteins* (OMPs) expostos. O antígeno 29-kDa é constituído pelo Omp25 e Omp31, que codificam as proteínas maiores de membrana desse gênero (CASTRO et al., 2010; VISCAÍNO et al., 2001). Sendo, a Omp25 envolvida na invasão, replicação e sobrevivência da *Brucella ovis* no interior das células hospedeiras (CARO-HERNÁNDEZ et al., 2007; MARTÍN-MARTÍN et al., 2008).

## 2.4 Reservatório

A *Brucella* spp. conforme determinadas condições podem ser transmitidas a outras espécies animais, no entanto há uma predileção, assim a espécie *B. abortus* acomete, preferencialmente, bovinos, bem com *B. melitensis* caprinos, *B. suis* suínos, *B. ovis* ovinos, *B. canis* canídeos (NOGUEIRA et al., 2006). A *Brucella ovis* infecta, naturalmente, a espécie ovina, no entanto já houve confirmação da transmissão através de carneiros infectados, com esse agente etiológico, para cervos que eram criados no mesmo pasto, e também entre cervos contaminados (RIDLER et al., 2000; RIDLER et al., 2002). De forma experimental, há relatos de que caprinos jovens e adultos também podem ser infectados, no entanto são menos vulneráveis quando comparados aos ovinos, sendo a infecção, nos caprinos, de caráter leve e de breve duração (BURGESS et al., 1985).

## 2.5 Epidemiologia

Descrita inicialmente por Buddle e Boyes (1953), na Nova Zelândia, a infecção tem atual distribuição cosmopolita e tem sido diagnosticada em praticamente todos os países em que a ovinocultura representa atividade de grande interesse econômico (SPENCER e BURGUESS, 1984; ESTEIN, 1999). A *B. ovis* possui cadeia epidemiológica semelhante às espécies brucélicas, sendo assim, a principal forma de infecção é o animal que está contaminado, podendo ser apenas reservatório ou animal enfermo, que irão contaminar o pasto, água e alimentos através de excreções e secreções corporais, que serão eliminadas através do trato do sistema reprodutor, leite, anexos fetais, e urina, constituindo, então, as formas de eliminação da bactéria (LIRA; MEGID, 2009). A brucelose ovina possui relatos em vários países da Europa, América do Norte e Latina, Oceania e também países que possuem a prática da produção de ovinos como principal atividade (WHO, 2006).

A doença, anteriormente relacionada na Lista B das enfermidades de declaração obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006), agora está incluída na lista única, a qual desde o ano de 2006 substituiu as Listas A e B sendo, então uma enfermidade de notificação compulsória. A probabilidade dos animais se infectarem depende da via de infecção, da dose infectante e de algumas características intrínsecas dos animais, como idade, raça e sexo (BLASCO, 1990; BARBERAN, 1997; BURGESS, 1982). O alto percentual de machos sororeagentes reforça a importância na epidemiologia da doença, pois o agente pode ser eliminado pelo sêmen de animais contaminados por até dois anos após infecção, além de infectar um grande número de fêmeas (AZEVEDO et al., 2004a).

A idade também constitui um fator importante na epidemiologia da doença, em que animais mais velhos são mais afetados, e machos impúberes são contaminados através da urina de animais doentes, a bactéria penetra através de mucosas (oral, nasal, conjutival) e por via subcutânea por meio de lesões de continuidade (ALTON et al., 1988; BULGIN, 1983; TAMAYO et al., 1989). As fêmeas são mais acometidas com idade entre 1 e 4 anos, mas são mais resistentes à infecção do que os machos. A susceptibilidade pode estar relacionada à raça, pois alguns animais são mais precoces à atividade sexual, e o tamanho do rebanho

também pode ser um grande fator, pois o aglomerado de animais facilita a disseminação do agente bacteriano (PINHEIRO JUNIOR, 2009).

A *B. ovis* causa uma doença que possui distribuição mundial, e promove prejuízos econômicos em países que têm a ovinocultura bem desenvolvida (ROBLES et al., 1998). Vários estados do Brasil são acometidos *pela Brucella ovis*, sendo que o Rio Grande do Norte, ao ser realizado o teste IDGA, 35% dos animais foram reagentes (103 animais de um total de 290). Estudos sobre frequência do agente etiológico na Bahia foram realizados na Microrregião de Juazeiro e no Recôncavo sendo, respectivamente, encontrado os valores 0,72% e 3,28%. Os animais que foram reagentes ao IDGA no estudo realizado na região do recôncavo baiano, não apresentaram alterações no epidídimo, além de serem negativos para *B. abortus* através do Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (ARAÚJO et al., 2013; SILVA et al., 2009).

## 2.6 Transmissibilidade

A brucelose ovina pode ter transmissão através do contato direto com animais contaminados e também via transplacentária, além da contaminação indireto, que pode ocorrer com a ingestão de água e alimentos contaminados (CASTRO; GONZALEZ; PRAT, 2005), fômites e também quando realizada a inseminação artificial (BRASIL, 2006). A bactéria penetra no organismo por diversas vias, como, respiratória, digestiva, mucosas (prepucial, conjuntival, e vaginal), e pele, caso tenha alguma lesão (BRASIL, 2006), sendo que a principal forma de transmissão, para os ovinos, é a venérea passiva, em que machos sadios se infectam ao cobrirem ovelhas previamente cobertas por carneiros já infectados. A transmissão também ocorrer de carneiro para carneiro, quando os machos dominantes “cobrem” os dominados, ou através da lambadura do prepúcio. A principal fonte de infecção para o rebanho é o macho infectado, sendo o sêmen a principal via de eliminação do patógeno. Ovelhas infectadas excretam o agente nas descargas vaginal e no leite. Carneiros persistentemente infectados excretam o agente, no sêmen, por um período que pode variar entre 2 a 4 anos, de maneira intermitente (CFSPH, 2007). A bactéria na fêmea não persiste por muito tempo, sendo seu papel menos importante

como foco de infecção quando comparada com o reprodutor que permanece infectado por toda a sua vida (PAOLICCHI et al., 1991, PAOLICCHI et al., 2000).

## 2.7 Patogênese e sinais clínicos

A capacidade da *Brucella* spp. em causar doença requer algumas etapas críticas durante a infecção. A brucelose invade células epiteliais do hospedeiro, permitindo que a infecção ocorra através de superfícies mucosas. A *Brucella ovis* entra no organismo do hospedeiro através das mucosas do trato digestivo, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. A mucosa orofaríngea é a principal via de infecção, além da mucosa genital (NELSON; COUTO, 2010). Em seguida, o agente é fagocitado, principalmente, pelos macrófagos e são carregados até os linfonodos, onde multiplicam-se e podem permanecer por muito tempo, de semanas a meses. Depois da infecção, as células do sistema mononuclear fagocitário, sobretudo macrófagos, ligam-se à bactéria através de receptores específicos ou com a ajuda dos anticorpos opsonizantes. Assim, o agente infeccioso é interiorizado, digerido e suas frações antigênicas são expostas na superfície da membrana celular. Em seguida, a *Brucella* spp. multiplica-se e são transportadas até os linfonodos regionais, em que se multiplicam novamente e causam bacteremia que culmina pela colonização dos órgãos alvos (útero grávidico da ovelha e epidídimo dos carneiros) (SHIN; CARMICHAEL, 1999).

Após a multiplicação inicial, a bactéria atinge a corrente sanguínea através do ducto torácico, dentro dos macrófagos ou livres no plasma. Podem ocorrer vários períodos de bacteremia. Depois se difundem para os tecidos do hospedeiro, colonizando principalmente órgãos constituídos por células do sistema mononuclear fagocitário, como, baço, fígado e linfonodos (principalmente os supra mamários), onde podem acarretar alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos levando à hepatomegalia, esplenomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide (BISHOP et al., 1994). Uma vez ingressado o patógeno no animal, e colonizado os linfonodos regionais, onde se multiplicam de maneira ativa, irão circular pelo sangue durante 60 a 70 dias, provocando bacteremia, e depois de se instalarem em alguns órgãos, 30 dias depois da infecção finalmente atingem os

órgãos genitais (PAOLICCHI, 2001). A brucelose ovina pode ser caracterizada por vários graus de epididimite e orquite em carneiros, com consequências no potencial da fecundidade dos carneiros, abortos ocasionais nas ovelhas e aumento da mortalidade perinatal dos cordeiros (CLEMENTINO et al., 2007).

O principal sinal clínico nos machos é a baixa qualidade seminal, com redução na concentração total e da proporção de espermatozóides viáveis, além de reação inflamatória na bolsa escrotal e reações sistêmicas como febre, taquipnéia e depressão. Quando a síndrome desaparece, é possível verificar através da palpação, alterações no epidídimo (epididimite) unilateral ou bilateral, testículos com tamanhos diferenciados e aumento do tamanho da bolsa escrotal. No entanto, mesmo que a *B. ovis* esteja associada à epididimite, alguns carneiros infectados não desenvolvem epididimite palpável. A inflamação no epidídimo pode ocorrer mesmo sem sinais clínicos visíveis, possibilitando a palpação das túnicas da bolsa escrotal, que podem apresentar espessamento, fibrose, e aderências entre as túnicas visceral e parietal, e os testículos podem estar atrofiados (GOMES, 2007; NOGUEIRA et al., 2006).

Nas ovelhas é comum ocorrer placentite, má formação fetal, aborto, nascimentos de cordeiros fracos ou debilitados e natimortalidade. Pode-se observar também o aumento do período da estação de monta com repetição de cios (superior a 45 dias) (BLOOD et al., 1989). Em ovelhas jovens ocorre endometrite e vaginocervicite, tendo como consequência infertilidade temporária (HOMSE et al., 1995). A bactéria irá colonizar o epidídimo e células inflamatórias aparecerão no sêmen em cerca de 2 a 8 semanas pós infecção, e então a qualidade seminal começa a ser deteriorada. Lesões palpáveis desse órgão serão detectadas a partir de 9 semanas. O início da sintomatologia clínica dessa enfermidade caracteriza-se por febre, dispnéia, desgaste físico, e inflamação dos órgãos do sistema reprodutor, que pode apresentar-se de forma crônica ou aguda (MEGID; MATHIAS; ROBLES, 2010, RADOSTITS et al., 2002).

Em casos agudos pode-se observar aumento de volume dos órgãos acometidos, isso ocorre devido ao processo inflamatório instalado, podendo ocorrer obstrução dos canais do epidídimo, o que irá possibilitar bloqueio da passagem de sêmen, além disso, os testículos também podem ser atingidos. Em casos crônicos a

inflamação delimita-se à cauda do epidídimo, mas os testículos terão tamanhos diminuídos e os sintomas podem regredir, no entanto animais reprodutores permanecem infectados (ISHIZUKA et al., 2010).

## **2.8 Diagnóstico**

A Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), é considerada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como teste padrão de triagem para diagnosticar a brucelose ovina, sendo os animais positivos, a esse método, submetidos para confirmação através do teste de Fixação Complemento. Há outros testes que podem ser usados para o diagnóstico dessa enfermidade, como Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto e competitivo, e técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e o diagnóstico clínico obtém melhor resultado quando associado aos métodos laboratoriais (BRASIL, 2006). A *B. ovis* pode ter diagnóstico realizado utilizando-se fundamento clínicos, mas sempre associado a critérios bacteriológicos, bem como, sorológicos, pois alguns animais podem estar infectados e não apresentarem alterações (FICAPAL et al., 1998; GENNERO et al., 2004).

### **2.8.1 Diagnóstico Clínico**

No Brasil o primeiro diagnóstico clínico de brucelose, provocada pelo agente *Brucella ovis*, foi consolidado por RAMOS et al. (1966), que realizaram inquérito com 3.317 reprodutores ovinos machos, sendo observado lesões clínicas no epidídimo e confirmação com isolamento e identificação do agente bacteriano. BOBLEL et al. (1972), isolou pela primeira vez esse agente etiológico no estado do Rio Grande do Sul. Mesmo que a *B. ovis* esteja associada à epididimite, alguns carneiros infectados não desenvolvem essa alteração de maneira palpável (GOMES, 2007). Logo, o exame clínico não é considerado o suficiente para obter um diagnóstico seguro, no entanto, pode ser utilizado em associação com o isolamento da *B. ovis* do sêmen, além de resultados positivos nas provas sorológicas, devendo-se levar em consideração os dados epidemiológicos do rebanho (CLEMENTINO et al., 2007).

O exame clínico pode, eventualmente, revelar alterações dos testículos e epidídimo e freqüentemente observam-se alterações no espermograma. Nem todos os animais infectados apresentam os sinais clínicos característicos e a enfermidade deve ser diferenciada de traumas ou de outros agentes infecciosos como *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corinebacterium psudotuberculosis ovis*, *Chlamydophila abortus* que também podem causar epididimite (NOGUEIRA et al., 2006; BULGIN et al., 1983).

Na realização de exame clínico, poucos animais podem apresentar sinais da infecção por *B. ovis*, logo o diagnóstico não é específico, pois a epididimite pode ser causada por outros micro-organismos, devendo então sempre ser associada a outra técnica (KOVÁCOVÁ et al., 2007). A brucelose ovina determinada por exame clínico possui baixo valor para realização do diagnóstico da infecção, pois há a existência de animais que não apresentam sintomatologia clínica (BAIGUN et al., 2000; MIYASHIRO et al., 2003; ARSENOULT et al., 2004). Essa bactéria pode provocar infecção subclínica, logo, para que um animal seja considerado negativo, além do exame clínico, deve ser realizado o exame bacteriológico seminal ou testes sorológicos, como IDGA, FC e ELISA, que são os mais utilizados em muitos países, inclusive no Brasil (NIELSEN et al., 2008).

## **2.8.2 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial consiste no isolamento e identificação da *B. ovis* através de meios seletivos. Além disso, exames sorológicos e técnicas moleculares também possibilitam diagnóstico seguro (CLEMENTINO et al., 2007).

### **2.8.2.1 Isolamento e Identificação**

O isolamento e a identificação de *Brucella* possibilita um diagnóstico definitivo e pode ajudar na epidemiologia e também no monitoramento, tornando possível o progresso do programa de vacinação (CORBEL et al., 2006). O método de diagnóstico mais confiável da doença é estabelecido mediante o isolamento do patógeno em animais com suspeita. No entanto, possui limitada sensibilidade, além

de custo alto e dificuldade do isolamento, o que torna inviável a aplicação deste exame em grande escala para campanhas de controle. Pode ser utilizado vários materiais para o isolamento, como sêmen, urina, secreção vaginal ou de leite. A temperatura ótima para crescimento da *B. ovis* é de 37°C, sendo a temperatura ideal entre 20°C a 40°C e o pH ótimo é entre 6,6 a 7,4 (BLASCO et al., 1990).

Nas provas bioquímicas é catalase positiva, geralmente oxidase positiva e quimiorganotróficas. Grande parte das cepas requerem meios de cultivo seletivo e complexo, contendo aminoácidos, tiamina, nicotinamida e íons de magnésio. Algumas cepas podem ser induzidas ao crescimento em meio mínimo, contendo sais de amônio como única fonte de nitrogênio. O crescimento é promovido pela adição de soro ou sangue. Não produzem indol, não liquefaz a gelatina ou soro coagulado, não lisam hemácias, não produzem metil carbinol (Teste de Voges-Proskauer), vermelho de metila negativo (GOMES, 2007).

O isolamento bacteriano é uma técnica de diagnóstico demorada e nem sempre eficiente, pois a bactéria é eliminada de forma intermitente no sêmen de animais contaminados (BAIGÚN et al., 2000; WORTHINGTON; STEVENSON, DE LISLE, 1985), mas pode não ser eliminada no sêmen de carneiros que possuem alterações epididimárias, o que pode ocasionar a obtenção de resultados falso-negativos neste teste, exigindo que o mesmo seja realizado de forma seriada para uma maior confiabilidade. O crescimento bacteriano pode ser observado no período de 3 a 4 dias pós- incubação, e após 7 dias pode-se obter a confirmação de um resultado negativo (BURGESS, 1982).

### **2.8.2.2 Sorologia**

A brucelose ovina tem diagnóstico realizado, geralmente, através de provas sorológicas, sendo as mais utilizadas as de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), Fixação de Complemento (FC) e ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto ou competitivo (ROBLES, 1998). Estudos comparativos demonstraram que o teste de ELISA é mais sensível (97,6%) quando comparado ao de IDGA (96,4%) e ao de FC (92,7%) (MARÍN et al., 1989). O IDGA além de sensibilidade alta possui especificidade de 100% (TECPAR, 2008). Os testes sorológicos existentes para *B.*

ovis podem ter falhas, as quais, geralmente, estão relacionadas à sensibilidade apresentada. Essas dificuldades no diagnóstico da enfermidade explicam o motivo pelo qual a brucelose ovina tem diagnóstico geralmente realizado mediante o emprego de duas ou mais técnicas para a obtenção de um resultado conclusivo, o que pode exigir custo alto e ser demorado (GIL TURNES, 1998). O IDGA é recomendado pelo MAPA como teste padrão de triagem, sendo os animais reagentes a esse método de diagnóstico submetidos a FC para confirmação dos resultados. Os métodos que são classificados como indiretos, baseados em testes sorológicos, são largamente utilizados em programas que visam controle e também erradicação da brucelose ovina (BRASIL, 2006).

#### **2.8.2.2.1 Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)**

O IDGA é um método de diagnóstico indireto que apresenta sensibilidade semelhante à Fixação Complemento, no entanto sua execução é mais simples. De acordo com as normas contidas no projeto de Instrução Normativa, que institui o Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina do MAPA, para certificar propriedades livres ou para fins de trânsito, carneiros não castrados, com idade superior a 6 meses, devem ser testados com o teste de rotina, IDGA, que é um teste de triagem, e caso seja positivo o teste confirmatório a ser utilizado é a FC (BRASIL, 2006; NOGUEIRA et al., 2006).

Esse método de diagnóstico tem como base o uso de lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas específicas da parede celular de cepas de *Brucella* como antígenos. Logo, permite a detecção de anticorpos em soros de animais contaminados (BLASCO et al., 1984). A dificuldade em se obter um diagnóstico sorológico que tenha boa especificidade e sensibilidade, que possa ser interpretado individualmente, faz com que o diagnóstico conclusivo para a brucelose ovina seja associado à utilização de mais de uma técnica, o que dificulta por conta do tempo e dos custos (NOZAKI, 2004).

#### **2.8.2.2.2 Fixação de complemento (FC)**

O teste FC é amplamente utilizado para a realização da confirmação, de testes positivos, no diagnóstico de brucelose em diferentes espécies animais (FERREIRA et al., 2003). A Fixação de Complemento é uma forma diagnóstico utilizado para identificação de anticorpos, com especificidade alta, da classe IgG (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

A sensibilidade da FC é de 88%, e a especificidade é de 100% (GARIN-BASTUJI, 2006). No entanto há algumas desvantagens, como a subjetividade na interpretação de baixo título, pode não funcionar quando o soro estiver hemolisado, podendo coagular durante a inativação, há a necessidade de uma elevada quantidade de reagentes, e há também a dificuldade na distinção de animais doentes e de vacinados, bem como há a existência do fenômeno de pré-zona, em que ocorrem reações negativas em diluições séricas inferiores, isso pode acontecer por conta do excesso de anticorpo (BLASCO, 2001; BLASCO, 2002).

#### **2.8.2.2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) baseia-se em reações antígeno-anticorpo, que são detectáveis através de reações enzimáticas. Esse método indireto de diagnóstico tem como característica um elevado valor de especificidade e sensibilidade. Existe alguns tipos de ELISA, como o ELISA indireto e o competitivo. A sensibilidade dos testes IDGA e ELISA indireto são parecidas e pode ser maior do que o FC (OIE, 2015; ESTEIN, 2002).

No ELISA indireto visa-se buscar anticorpos contra o antígeno *B. ovis*. Se houver, no soro a ser testado, a presença de anticorpos ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo, que será detectada após a adição de um anticorpo, anti-IgG (Conjugado) dirigido contra imunoglobulinas da espécie, a qual é ligada à peroxidase. O uso de um substrato a base de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) proporcionará coloração amarelada se ocorrer reação antígeno-anticorpo. Já o ELISA competitivo, em que, no soro, a presença de anticorpos, a ser testado, é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno. O resultado

será obtido pela adição do conjugado, no entanto a coloração ocorrerá nos poços onde não há presença de anticorpos. Mesmo que o soro esteja hemolisado, e utilizando-se pequena quantidade, os resultados são bons (COELHO; DÍEZ, COELHO, 2014; EISTEN, 1999; JAQUES et al., 1998; MARTINS, 2012;).

Os testes ELISA tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e para o diagnóstico de algumas enfermidades, pois oferecem alta especificidade e sensibilidade, sendo de simples execução, necessitando de poucos equipamentos, no entanto, os resultados podem variar entre laboratórios dependendo da metodologia utilizada (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Tem como vantagem o grande número de amostras que podem ser analisadas ao mesmo tempo, reduzindo então o período de resultados e custo, além de ser quantitativos, simples e requerem pequenos volumes de amostras. As técnicas de diagnóstico ELISA e IDGA são mais confiáveis quando utilizadas juntas, pois proporcionam a detecção de *B. ovis* com maior sensibilidade (NOZAKI et al., 2004).

O ELISA indireto pode ser utilizado como contribuição para as políticas de erradicação, pois é um teste que oferece a eficácia de demonstrar ausência de infecção em uma população de animais, individualmente (OIE, 2015). De acordo com Greve et al. (2011) essa técnica apresenta-se eficaz quando relacionado ao histórico clínico, podendo ser proposto como um teste de diagnóstico capaz de detectar um número maior de animais reagentes, facilitando o controle e colaborando para a prevenção de rebanhos suspeitos da brucelose ovina.

### **2.8.2.3 Técnicas moleculares (PCR)**

O diagnóstico da epididimite dos carneiros é realizado por meio de exame clínico, testes sorológicos e através da bacteriologia. Devido às limitações apresentadas pelas técnicas, o diagnóstico é geralmente obtido através da aplicação de duas ou mais técnicas para que possa ser alcançado um resultado conclusivo, logo estudos têm sido direcionados para a aplicabilidade e adequação do diagnóstico através de técnicas moleculares. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica aplicável, pois é sensível, pouco onerosa, quando comparada ao isolamento e

identificação do agente bacteriano, rápida, simples de ser realizada e permite o diagnóstico específico do agente infeccioso (BRICKER, 2002; COSTA, 2010; OIE, 2015).

Essa técnica tem demonstrado possuir sensibilidade semelhante ou até mesmo superior, quando comparada ao cultivo microbiológico para *Brucella ovis*, além de possibilitar identificação rápida do patógeno em amostras de urina e também de sêmen (MANTEROLA et al., 2003; NOZAKI, 2004; SAUNDERS et al., 2007; XAVIER et al., 2010).

O teste de PCR pode ser utilizado como um teste complementar, ajudando a melhorar a capacidade para diagnosticar carneiros infectados com *B. ovis*, além de ser possível diferenciar se a epididimite foi causada por outras bactérias (MANTEROLA et al., 2003). Com o advento do sequenciamento das principais espécies de *Brucella*, métodos biomoleculares têm sido estudados, pois a finalidade é a obtenção de um diagnóstico específico, de forma que seja possível determinar a espécie do agente etiológico presente na amostra analisada (COSTA, 2010).

O diagnóstico da *B. ovis* por PCR é realizado para detectar a presença de DNA brucélico em uma amostra (BRICKER, 2002). Existe um tipo de PCR, espécie-específica, que amplifica uma determinada região gênica, a qual tem ocorrência específica em *B. ovis*, mas a frequência gênica dessa região é inferior quando comparada à regiões que utilizam técnicas gênero-específicas, e isso é importante, pois pode haver redução quanto à sensibilidade do teste espécie-específico (XAVIER et al., 2010).

Dentre os tipos de reação de PCR mais comuns tem-se a RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction), essa reação é composta pela transcrição reversa e a amplificação, há também a Multiplex PCR, em que mais de um segmento genômico é amplificado em uma única reação, cada um com seu par de primers específico, podendo verificar gênero, espécie bacteriana e diferenciar de outros agentes. A técnica de PCR, quando comparada com o diagnóstico sorológico, tem como vantagens alta especificidade e sensibilidade, os resultados são mais rápidos, e oferece menor risco (COELHO, 2014).

## 2.9 Controle e prevenção

Um dos motivos de grande importância de desarranjos reprodutivos em animais é a infecção por micro-organismos do gênero *Brucella*. Os prejuízos econômicos provocados por esses agentes vão além dos problemas relacionados ao sistema reprodutor. A condenação de carne e leite é um dos principais motivos de perdas, para as indústrias, assim como, barreiras internacionais são postas ao comércio dos produtos de origem animal, além da redução no preço desses produtos e derivados, bem como gastos maiores para instalação de programas para controle e prevenção, além de pesquisas (JARDIM et al., 2006).

A manutenção da *B. ovis* no rebanho é o carneiro contaminado, ele também é responsável pela transmissão dentro do rebanho e de um pasto para outro. Logo, o controle dessa enfermidade tem como base a eliminação de carneiros que apresentarem diagnóstico bacteriológico ou sorológico positivos, pois se eles permanecerem no rebanho continuará disseminando a bactéria e infectando os demais animais, tanto machos, quanto fêmeas (ESTEIN, 1999).

A vacinação é o método mais econômico e prático para controlar essa enfermidade em áreas que apresentam prevalências médias e altas (ROBLES, 2004). A maioria das vacinas utilizadas tem demonstrado serem eficientes contra a infecção pela *B. ovis*, mas há a desvantagem de induzir a produção de anticorpos indistinguíveis aos produzidos pela infecção natural, dificultando, assim, o diagnóstico sorológico (BLASCO et al., 2002). No entanto, o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos não prevê a vacinação de ovinos contra a brucelose ovina, e nem o tratamento, sendo o ideal a ser realizado o descarte dos reprodutores (BRASIL, 2006).

A vacina viva de *B. melitensis* Rev 1 é considerada a melhor dentre as disponíveis, sendo utilizada uma única dose de 1 mL ( $10^9$  unidades formadoras de colônia) por via subcutânea ou 25-30  $\mu$ L por via conjuntival em fêmeas com idade entre 3 a 5 meses, o que confere imunidade de longa duração. A vacinação através da via conjuntival apresenta a vantagem de minimizar a intensidade da reação cruzada da vacina com os testes sorológicos. Quando aplicada em animais na idade recomendada, as reações adversas são mínimas. Não há informações suficientes

que recomende a vacinação de reprodutores adultos, e a restrição quanto ao uso de Rev 1 é a impossibilidade de se utilizar em países que são livres de *B. melitensis* e endêmica para *B. ovis* (OIE, 2015; BLASCO, 1990).

O manejo e a regularidade da limpeza das instalações são fatores muito importantes para o controle dessa enfermidade. O sistema extensivo e a ovinocultura de subsistência, sendo que no primeiro método de criação os animais permanecem soltos em áreas grandes e o produtor não realiza qualquer forma que seja de controle reprodutivo ou sanitário, é o perfil predominante nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (LEITE, 2000; SOUZA et al., 2007). Logo, faz-se necessária a adoção de medidas sanitárias que visam o controle e prevenção para evitar a propagação da doença (SILVA et al., 2003).

Portanto, é importante estabelecer como medidas de controle a identificação e eliminação de animais contaminados, doentes ou portadores, além do bloqueio da introdução de novos animais infectados no rebanho. Sendo assim, é fundamental a existência de métodos diagnósticos que sejam eficientes, rápidos e viáveis de serem executados (COSTA, 2010), sendo eles realizados através da combinação do exame clínico, isolamento da bactéria de amostras de sêmen e de tecidos e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo (ALTON et al., 1988; GRILLÓ et al., 1999).

A maioria dos criadores de ovinos desconhece a importância da exigência de documentos sanitários para a compra dos animais. A falta dessa documentação predispõe o rebanho a riscos, podendo ser introduzidos diversos agentes infecciosos relevantes, bem como a *B. ovis*. O trânsito entre rebanhos e regiões diferentes, além da baixa frequência de quarentenário pode ser considerado importantes fatores contribuintes para a disseminação de doenças (GOUVEIA et al., 2009). Nos locais que possuem programas de controle, a prevalência dessa enfermidade é baixa, no entanto, a erradicação é difícil de ser almejada (BLASCO, 1990).

### **3 Objetivo**

#### **3.1 Objetivo geral**

Padronizar um ensaio imunoenzimático indireto utilizando um antígeno comercial para diagnóstico de *B. ovis*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Padronizar um antígeno comercial utilizado para IDGA no diagnóstico da brucelose ovina;
- Comparar os ensaios imunoenzimáticos indiretos com antígenos diferentes de *Brucella ovis* e *Brucella canis*;
- Estudar o desempenho dos testes quanto à sensibilidade e especificidade.

## **4 Metodologia**

O estudo foi realizado no laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), durante o mês de junho de 2015.

### **4.1 Amostras**

Foram utilizadas 40 amostras de soro de ovinos, comprovadamente negativas no teste Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), cedidas pela pesquisadora Msc. Gabriela dos Santos Santana, do setor de Clínica de Grandes Animais da UFRB, e 40 amostras de soro de ovinos positivas, sendo 3 delas cedidas pela mesma pesquisadora, comprovadamente positivas pelo IDGA, e o restante obtidas através da diluição dos controle positivos do kit comercial para diagnóstico de brucelose ovina do laboratório TECPAR<sup>®</sup>, partida 001/14 fabricação JUL/14 e, partida 002/15 fabricação SET/15. Todas as amostras positivas passaram pelas seguintes diluições: Antígeno puro, diluições seriadas de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. Sendo o total de amostras testadas igual a 80.

### **4.2 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI)**

#### **4.2.1 Diluição dos antígenos**

Para escolher a diluição a ser utilizada, foi realizada a padronização da diluição, utilizando um antígeno comercial composto por proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da bactéria *B. ovis*, amostra Reo 198, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR<sup>®</sup>), diluindo-os em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) nas diluições de 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800. Todas as diluições foram testadas utilizando o branco, controle negativo, controle positivo 1:100 e controle positivo 1:200. Para a diluição do antígeno de *B. canis*, cedido pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRB, foi utilizado a diluição 1:200, como descrito por Lucero et al. (2002), adaptado.

#### 4.2.2 Padronização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto

Foi utilizado o antígeno submetido à padronização da diluição, do laboratório TECPAR, Partida: 001/14 e data de fabricação: JUL/14, e Partida: 002/15 e data de fabricação: SET/15, e um antígeno produzido através da cepa bacteriana de *Brucella canis*. Sendo empregado o protocolo descrito por Putini et al. (2008), modificado, em que foram utilizadas placas de poliestireno do fundo chato (COSTAR® 3590) com 96 poços cada.

Para a sensibilização foi utilizado antígeno comercial, na diluição de 1:800 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Depois de diluído, as placas foram sensibilizadas adicionando-se 100µl do antígeno diluído em cada poço da placa, colocando-a em câmara úmida e incubada “*Over night*” durante o período de 16 a 18 horas sob temperatura de 4 a 8°C. Ao passar esse período, os poços foram lavados por duas vezes com solução de Phosphate Buffer Solution-T-20 (PBS-T). Posteriormente, foi adicionado 200µl de uma solução de PBS-T com leite desnatado (Molico) a 5% para realização do bloqueio de sítios livres reativos e, sendo as placas incubadas, novamente, em câmara úmida, por 2 horas a 37°C.

Em seguida, a placa foi lavada uma vez com PBS-T, adicionando-se aos poços 50µl dos soros testes dos animais, posteriormente, 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. Depois desse 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.

A placa foi levada novamente para incubação por 1 hora a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes e, sendo adicionado 50µl da solução reveladora, que é composta por 4mg de OPD (ortophenylene-diamine) com presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em 10ml de tampão citrato pH 5,1 e 30µl de água oxigenada. Após adicionar essa substância, a placa foi colocada em caixa escura, fora do contato direto com a luz, durante 15 minutos. Passado esse tempo, a reação foi interrompida sendo adicionado 25µl de Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e, levado para realização da leitura em uma leitora de ELISA com filtro de 490 nm de comprimento

de luz. Para a padronização do ELISA indireto utilizando um antígeno de uma cepa de *Brucella canis* foi utilizada a diluição 1:200 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, sendo usado 50 µl do antígeno, e o protocolo utilizado foi o mesmo.

#### **4.2.3 Estudo Estatístico**

Foi realizado estudo através do ponto de corte, sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo.

##### **4.2.3.1 Cálculo do ponto de corte - “ cut-off ”**

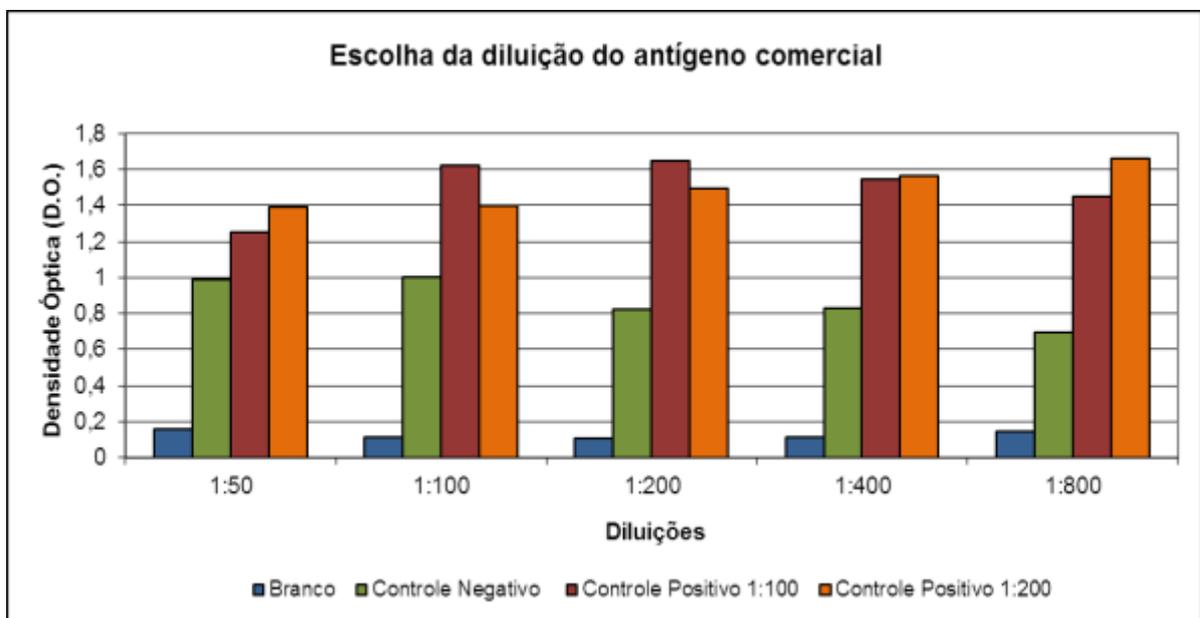
O ponto de corte foi definido através da fórmula da média de Densidade Óptica das amostras de soro ovino não reagentes + 2 x desvio padrão (FREY et al., 1998).

##### **4.2.3.2 Cálculo de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo**

Os valores da sensibilidade e da especificidade foram realizados utilizando-se os resultados obtidos do ELISA, sendo as fórmulas utilizadas definidas por Mathias et al. (1998). Em que a sensibilidade foi encontrada através da divisão de amostras sorológicas reagentes ao teste pelo total de amostras testadas, multiplicada por 100. E, a especificidade foi obtida através da divisão de amostras de soro não reagentes pelo número total de amostras testadas multiplicadas por 100. Já os valores preditivos das amostras negativas e positivas foram calculados de acordo com o valor do ponto de corte definido.

## 5 Resultados

De acordo com os valores da Densidade Óptica (D.O.), observados na Figura 01, não houve diferença significativa entre as diluições realizadas. Sendo escolhida, então, a diluição 1:800 com o intuito de otimizar o uso do antígeno comercial, do laboratório TECPAR, para diagnóstico da *B. ovis*, possibilitando sua utilização em baixa quantidade, não interferindo na sua eficácia e aumentando a sua capacidade no teste ELISA indireto, visando o aproveitamento para testar um maior número de amostras.



**Figura 01.** Demonstração dos valores obtidos na diluição do antígeno comercial para diagnóstico de *Brucella ovis*.

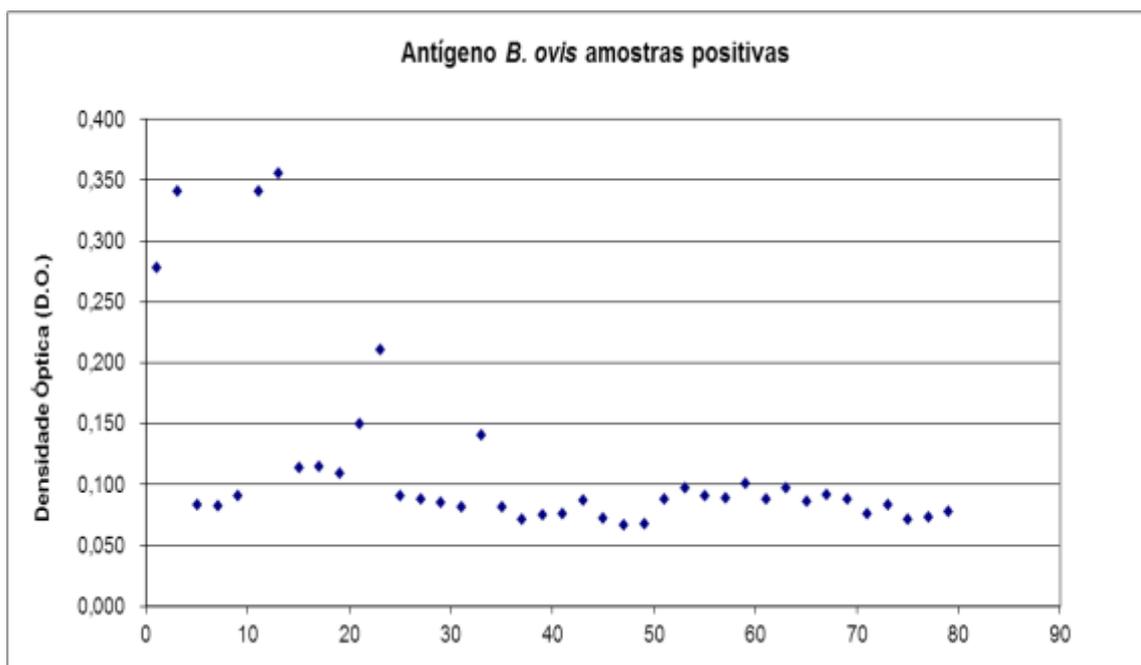
O ponto de corte definido para o ELISA indireto utilizando o antígeno comercial de *B. ovis* foi de 0,185 e para o de *B. canis* foi de 0,166 (Quadro 01). Utilizando esses pontos de corte, pôde-se observar que a D.O. das 40 amostras positivas testadas no teste ELISA indireto, usando o antígeno comercial de *B. ovis*, 5 apresentaram-se positivas. Já as 40 amostras negativas testadas, com o mesmo antígeno, 35 foram não reagentes.

Quando testadas as mesmas amostras utilizando o antígeno de *B. canis*, das 40 positivas 7 foram reagentes no ELISA indireto e, as amostras negativas, todas mostraram-se não reagentes.

**Quadro 01.** Definição do ponto de corte.

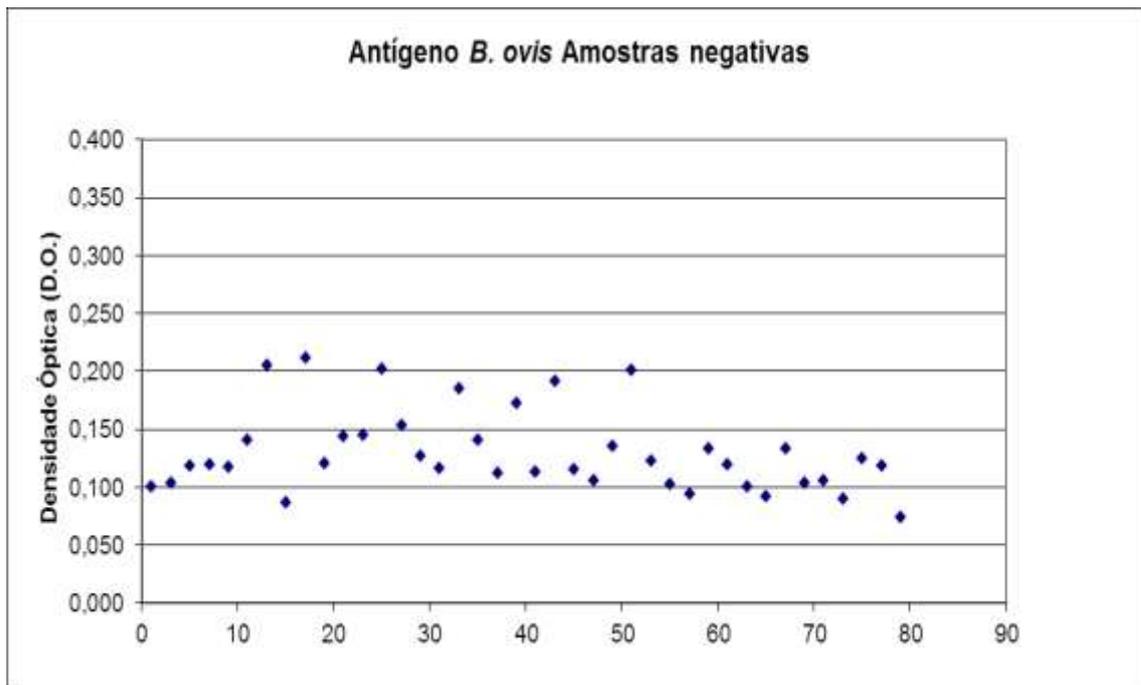
| Média + 2DP  | Ponto de corte |
|--|----------------|
| <b>ELISA com antígeno de <i>B. canis</i></b><br><b><math>0,1330 + 2 \times 0,016493</math></b> | <b>0,166</b>   |
| <b>ELISA com antígeno de <i>B. ovis</i></b><br><b><math>0,1304 + 2 \times 0,027188</math></b>  | <b>0,185</b>   |

Nos resultados das Densidades Ópticas, obtidos através do ELISA indireto, em que utilizou-se antígeno comercial de *B. ovis*, foi observado que as amostras positivas obtiveram, de acordo com o ponto de corte, baixa quantidade de amostras reagentes, tendo D.O. que variaram de valores extremos, como 0,3560 a valores inferiores, como 0,0670 (Figura 02).



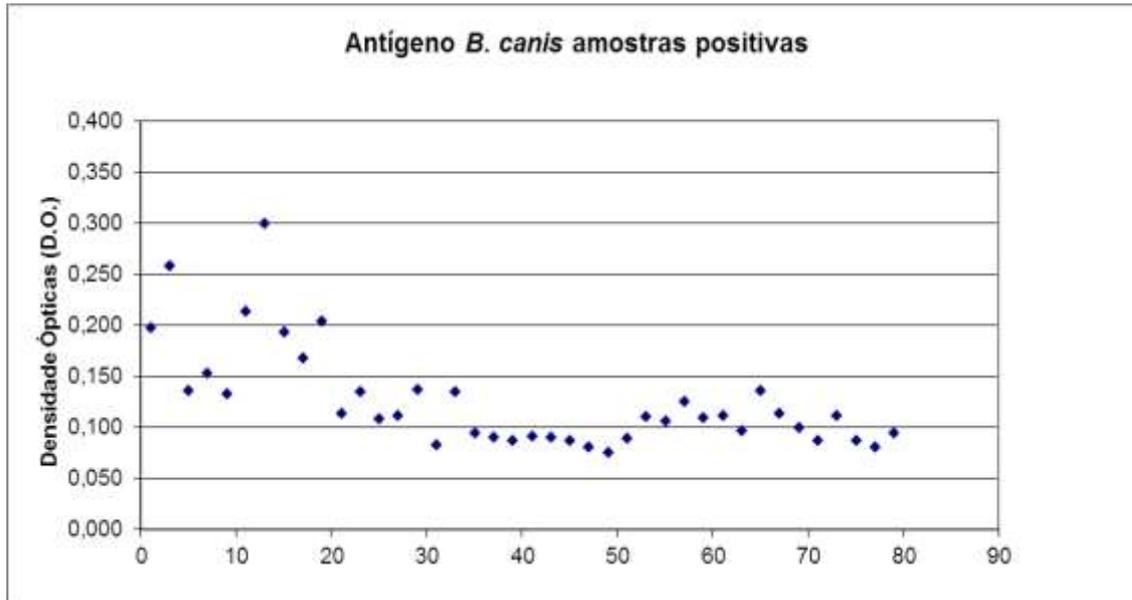
**Figura 02.** Resultados de amostras positivas através da utilização de um antígeno comercial de *B. ovis*.

Já nos resultados das amostras negativas, utilizando o mesmo antígeno comercial de *B. ovis*, pôde-se observar que a D.O. foi abaixo do ponto de corte (0,185), demonstrando maior quantidade de amostras não reagentes (Figura 03), quando comparadas às reagentes das amostras positivas.

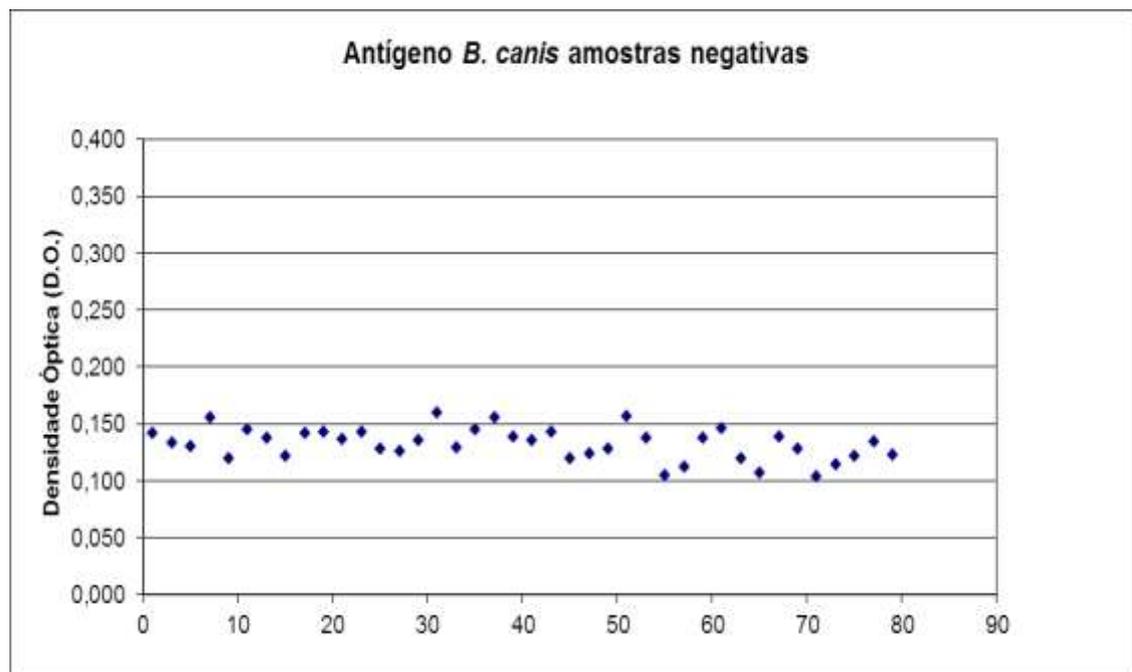


**Figura 03.** Resultados de amostras negativas através da utilização de um antígeno comercial de *B. ovis*.

O antígeno de *B. canis* demonstrou que a sua capacidade em detectar amostras positivas, para o diagnóstico da brucelose ovina, não foi tão relevante (Figura 04), quando comparado aos resultados das Densidades Ópticas que as amostras negativas, testadas com esse mesmo antígeno tiveram, pois de acordo com o ponto de corte obtido (0,166), demonstraram resultados viáveis, uma vez que demonstrou negatividade de todas essas amostras testadas (Figura 05).



**Figura 04.** Resultados de amostras positivas através da utilização de um antígeno de *B. canis*.



**Figura 05.** Resultados de amostras negativas através da utilização de um antígeno de *B. canis*.

São parâmetros substanciais para a definição de um determinado teste diagnóstico, a sensibilidade e a especificidade. Logo, quanto maior for a sensibilidade, maior será a capacidade de distinguir entre os animais suspeitos da doença aqueles que realmente estão doentes. E, quanto maior a especificidade do

teste, maior será a sua capacidade em distinguir os animais que são sadios e não apresentam a doença (GREINER; GARDNER, 2000). Assim, o teste ELISA indireto demonstrou 12,5% e 17,5% de sensibilidade, utilizando antígeno comercial de *B. ovis* e de *B. canis*, respectivamente. Já a especificidade do ELISA indireto utilizando antígeno de *B. canis* foi de 100% e de *B. ovis* foi de 92,5% (Tabela 01).

**Tabela 01** - Valores de sensibilidade, especificidade e ponto de corte.

| <b>Sensibilidade/Especificidade<br/>ELISA</b> | <b>Sensibilidade<br/>(%)</b> | <b>Especificidade<br/>(%)</b> | <b>Ponto<br/>de<br/>corte</b> |
|---|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>ELISA <i>B. ovis</i></b>                   | <b>12,5</b>                  | <b>92,5</b>                   | <b>0,185</b>                  |
| <b>ELISA <i>B. canis</i></b>                  | <b>17,5</b>                  | <b>100</b>                    | <b>0,166</b>                  |

Os valores preditivos calculados, para as amostras testadas no ELISA indireto, demonstraram 17,5% e 12,5%, das amostras positivas utilizando antígeno de *B. canis* e *B. ovis*, respectivamente, demonstrando a probabilidade dos soros de ovinos positivos para brucelose ovina serem realmente positivos. Já o valor preditivo das amostras negativas de *B. canis* foi de 100% e de *B. ovis* foi de 92,5%, atestando resultados altos de animais comprovadamente negativos (Tabela 02).

**Tabela 02** - Valores preditivos de amostras positivas e negativas.

| <b>ELISA indireto</b>                | <b>Valor Preditivo<br/>Amostras Positivas (%)</b> | <b>Valor Preditivo<br/>Amostras Negativas (%)</b> |
|--------------------------------------|---|---|
| ELISA indireto <i>B. canis</i>       | 17,5  | 100   |
| <b>ELISA indireto <i>B. ovis</i></b> | <b>12,5</b>                                       | <b>92,5</b>                                       |

## 6 Discussão

A diluição elegida do antígeno comercial para diagnóstico de *B. ovis*, nesse estudo, foi de 1:800, diferente do utilizado por Greve et al. (2011) que foi de 1:200, no entanto, observa-se que eles utilizaram as diluições apenas nas proporções 1:25, 1:50, 1:100 e, 1:200, diferente do que foi usado nesse estudo, uma vez que foram testadas mais proporções com aumento da diluição. Provavelmente se esses autores tivessem testados mais diluições, teriam observado que não haveria diferença significativa entre as diluições e escolheriam a maior diluição, tendo em vista que a eficiência do antígeno não seria comprometida.

O uso compartilhado de antígenos entre as espécies *B. canis* e *B. ovis* viabiliza a utilização deles, uma vez que esses agentes possuem proteínas de superfície semelhantes, sendo possível a realização do diagnóstico da brucelose ovina (AZEVEDO et al., 2004b). Ao utilizar um antígeno comercial de *B. ovis* pôde-se observar que a especificidade do teste ELISA indireto foi alta. Um teste de diagnóstico deve ter alta especificidade, levando em consideração a importância de verificar ausência de uma enfermidade, pois quanto mais elevada for a especificidade de um teste, maior será a chance de que os animais sadios, a serem analisados, sejam excluídos pelo mesmo. Além disso, testes específicos são mais vantajosos quando o intuito é a confirmação da enfermidade, e quando há falso-positivos em um método de diagnóstico, porque a conduta pode acarretar riscos ao paciente, bem como, prejuízos aos criadores, sendo que no caso da brucelose ovina os animais terão que ser descartados, sendo os testes altamente específicos importantes para minimizar esse erro (MENEZES; SANTOS, 1999).

No entanto, o presente trabalho não demonstrou bom desempenho com relação à sensibilidade, sendo necessário a importância de um teste de triagem mais sensível, como, por exemplo, a Imunodifusão em Gel de Agarose, podendo o teste ELISA indireto padronizado, com antígeno comercial de *B. ovis*, ser eficiente como teste confirmatório para a brucelose ovina, pois apresentou alta especificidade sendo capaz de eliminar animais falso-positivos. Segundo Greve et al. (2011) a sensibilidade está relacionada com a capacidade do teste ser positivo se o animal

estiver infectado, sendo assim, Myers e Siniuk (1970) encontraram em seu trabalho que o IDGA apresenta 96,4% de sensibilidade.

Apesar do melhor desempenho do antígeno de *B. canis*, com relação a especificidade, a indicação do ELISA indireto utilizando antígeno de *B. ovis* é mais recomendada pela especificidade antigênica que ele proporciona. Jorge (2007) verificou em seu estudo, que antígenos de extrato de uma linhagem de *B. canis* apresentaram resultados diferentes para animais doentes e animais saudáveis, mas com desempenho inferior ao estudo com antígeno comercial de *B. ovis*, porém os resultados apresentaram-se satisfatórios, sendo a sensibilidade e especificidade, respectivamente, 93,33% e 88,88%. Diferente desse estudo em que a sensibilidade obtida com o antígeno de *B. canis* foi de 17,5% e especificidade de 100%.

Greve et al. (2011) concluiu que o ELISA indireto realizado através de um antígeno comercial de *B. ovis* (Reo 198) diluído apresentou 100% e 95,6% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, demonstrando eficácia maior para o reconhecimento de animais sorologicamente positivos. No entanto, esses resultados foram diferentes do presente trabalho, isso pode ter acontecido devido a utilização de controles positivos comerciais e amostras de soro positivas no IDGA, serem utilizados em diluições seriadas, pois o teste pode não ter identificado quantidade de anticorpo suficiente para demonstrar positividade, devido as diluições.

## 7 Conclusão

A *Brucella ovis* e a *Brucella canis* não possuem a cadeia O de LPS, sendo, então, rugosas, e apresentam antigenicidade cruzada, podendo então, antígenos dessas espécies serem utilizados para diagnóstico da brucelose ovina. No teste ELISA indireto utilizando antígeno comercial de *B. ovis* e antígeno de *B. canis*, observou-se que esse último obteve melhor desempenho com relação à sensibilidade e especificidade, no entanto, a indicação de realizar esse teste utilizando antígeno de *B. ovis* é mais recomendado por conta da especificidade antigênica.

A padronização dessa técnica confere resultados satisfatórios para a distinção de animais não infectados, tendo alta especificidade, podendo ser o teste ELISA indireto utilizado como método confirmatório, sendo associado ao IDGA que possui alta sensibilidade, e colaborar, de maneira eficaz e otimizando o tempo, nos programas que visam o controle e erradicação da brucelose ovina.

## Perspectivas

- Utilização de amostras comprovadamente positivas para realizar melhor avaliação do parâmetro sensibilidade, tendo em vista que a utilização de controles positivos de um teste para diagnóstico de brucelose ovina pode ter influenciado nos resultados obtidos;
- Realização de testes de triagem e confirmatório para comprovação, das amostras sorologicamente positivas e negativas, de brucelose ovina, a serem utilizadas na padronização do teste ELISA indireto;
- Comparar o teste IDGA com o teste ELISA indireto para avaliar a efetividade, de ambos os testes, como métodos eficazes de diagnóstico dessa enfermidade.

## Referências

- 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.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. **Paris: INRA**, p.190, 1988.
- ARAÚJO, B. R.; COSTA, J. N.; SOUZA, T. S. de; LIMA, C. C. V. de; LEITA, M. D. X.; COSTA NETO, A. O.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALMEIDA, M. das G. Á. R.; LIMA, E. B. de. Seroepidemiology of sheep brucellosis in the microregion of Feira de Santana, BA, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 129-135, 2013.
- ARSENOULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; BÉLANGER, D. Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, n.4, p.312-314, 2004.
- AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; BATISTA, C. S. A.; CLEMENTINO, I. J.; SANTOS, F. A.; ALVES, F. A. L. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 25, n. 2, p. 45-50, 2004a.
- AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; KEID, L.B.; GRASSO, L. M. P. S.; PINHEIRO, S. R.; MASCOLLI, R.; ALVES, C. J. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 41(2), 2004b.
- 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.
- BARBERAN, M.; MARCO, J.C. Patogenia, cuadro clinico y lesional. **Tratado de Patología y Produccion Ovina**, n.52, p.35-49, 1997.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. Infectious diseases of livestock. **Austin: Texas A&M University Press, College Station**, v.2, p.1053-1066, 1994.
- BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K. and DUNCAN, J.R. Animal Brucellosis. **CRC Press, Boca Raton, Florida**, p.351-378, 1990.
- BLASCO, J.M. Control and eradication programmes of brucellosis in small ruminants and cattle. Implementation of Control and Eradication Programs in Animals, **Zaragoza**, Curso de Epidemiologia, 2001.
- BLASCO, J.M. Estrategias de control. Vacunas actuales y de nueva generación. *Ovis*, 87-101, 2002.
- BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M., ARUNDEL J.H. **Clinica veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 637-646, 1989.

BOBLEL, H.; Fernandes, J.C.T.; Mies Filho, A.; Ramos, A.A.; Trein, E.J. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. **Pesq. Agropec. Bras.**, 1972.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT. **Manual Técnico Brasília**, 2006.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.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.

BULGIN,M.S.; ANDERSON,B.C.; Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis In: **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 182, 372,1983.

BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis. A review. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.551-575, 1982.

BURGESS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.62, n.8, p.262-264, 1985.

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.

CARVALHO JÚNIOR, C.A.; XAVIER, M.N.; COSTA, L.F.; SILVEIRA, S.S.; SANT'ANNA, F.M.; BORGES, A.M.; GOUVEIA, A.M.G.; SANTOS, R.L. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.160-167, 2010.

CASTRO, J.R. et al. Brucelose canina - revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 41, Ed. 146, Art. 981, 2010.

CASTRO, H. A.; GONSALEZ, S. R.; PRAT, M. I. Brucelosis: una revisión práctica. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 39, n.2, p.203-216, 2005.

CFSPH - CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Brucellosis**. 2007. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/IICAB/>>. Acesso em: 05/09/15.

CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J. AZEVEDO, S. S.; PAULIN, L. M.; MEDEIROS, K. A. Inquérito soro-epidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, n. 27, v.4, p.137-143, 2007.

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 N° 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.; GILL, K.P.W.; THOMAS E.L. Methods for the identification of Brucella. **London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food**, 1978.

CORBEL M.J.; ELBERG S.S.; COSIVI O. Brucellosis in humans and animals. **Geneva: WHO Press**, 89p., 2006.

COSTA, Luciana Fachini da. Avaliação comparativa entre PCR gênero-específica, PCR espécie-específica e nested PCR espécie-específica no diagnóstico da infecção por *Brucella ovis*. 2010. 43 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2010. Disponível em: <[http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94670/costa\\_lf\\_me\\_botfmvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94670/costa_lf_me_botfmvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em 17/11/2015.

EMBRAPA. Enfermidades e Microrganismos Passíveis de Transmissão pela Carne, Leite e Derivados de Caprinos e Ovinos. 2006.

ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archive Medicine Veterinary**, n.1, p.5-15, 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.; DIAS, T. I.; MARIANO, I.; BELO, A.; PRETO, I. R.; MANTEIGAS, A.; FONSECA, A. P.; SÁ, M. I. C. de. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella mellitensis* infection in sheep. **Veterinary Research**, v. 34, p. 297-305, 2003.

FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J.M.; MORIYÓN, I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. **Small Ruminant Research**, v.29,p.13-19, 1998.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A. Statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunology Methods.**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

GARÍN-BASTUJI, B., Blasco, J.M., Marín, C., Albert, D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. **Small Rumin Res**, 2006, 62, 63-70.

GENNERO, M.S.; GRATAROLA, C.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DI GIANNATALE, E.; DONDO, A. Diagnostic Survey on Contagious Epididymitis of Rams in Piedmont(Italia). **International Society for Animal Hygiene**. Saint-Malo, 2004.

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

GOMES, M. J. P. Gênero *Brucella* spp. Microbiologia Clínica, **LABACVET**, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/brucella.pdf>> Acessado em: 18 de setembro de 2015.

GOUVEIA, A.M.G.; GUIMARÃES, A.S.; HADDAD, J.P.A. *et al.* Características zoonosológicas da ovinocultura em Minas Gerais, Brasil. In: **Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais**, 2009. Disponível em: <[http://www.caprileite.com.br/conteudo.php?id\\_conteudo88&id\\_links=4&id\\_sub\\_links=28](http://www.caprileite.com.br/conteudo.php?id_conteudo88&id_links=4&id_sub_links=28)> Acesso em: 14 de agosto de 2015.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Prev. Vet.Med.**, n.45, p.3-22, 2000.

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.

GRILLÓ, M.J., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M. Experimental *Brucella* ovisinfection in pregnant ewes. **Vet Rec** 1999, 15, 555-558.

GUL, S. T.; KHAN, A. Epidemiology and epizootology of brucellosis: a review. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 27, n. 3, p. 145-151, 2007.

HOMSE, A.C. *et al.* Infertilidad en ovejas por *Brucella ovis*. **Veterinary Argentina**, v.12,p.243-249, 1995.

ICSP, International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomia of *Brucella*. Disponível em: <http://icsp.org/subcommittee/brucella/> Acesso em: 02/10/2015.

ISHIZUKA, M.M.; LEITE,L.O.; DINIZ, O. Epidemiologia e profilaxia da epididimite infecciosa ovina (Brucelose Ovina), 2010. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=22&ar=1&nm=Sanidade%20Animal>. Acesso em: 09 de novembro de 2015.

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**, 1998, 64, 61-73.

JARDIM, G. C.; PIRES, P. P.; MATHIAS, L. A.; RIBEIRO, C.; KUCHEMUCK, M. R. G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006.

JORGE, J. S. Produção e padronização de um antígeno para um ELISA indireto no diagnóstico da brucelose ovina. **Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – União Metropolitana de Educação e Cultura**. Lauro de Freitas-BA, 45 f. 2007.

KOVÁCOVÁ, D. et al. Importance of serological diagnostics in ovine epididymitis caused by *Brucella ovis*. **Bulletin Veterinary Institute Pulawy**, v.51, p.219-224, 2007.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.

LEITE, E. R. **Ovinocaprinocultura no nordeste-organização e crescimento**. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/artigo14.htm>>. Acesso em: 01/09/2015.

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

LUCERO, N. E. ; ESCOBAR, G. I. ; AYALA, S. M.; LOPE, G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. **J. Med. Microbiol.** Vol. 51, 656–660, 2002.

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.

MARÍN, C.M.; JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.; MORIYÓN, I.; DÍAZ, R. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. **The Veterinary Record**, v.125, p.504-508, 1989.

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.

MATHIAS, L. A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus Bubalis*). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 3/4, p. 111-114, 1998.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 119-126, 2010.

MENEZES, A. M. B.; SANTOS, I. da S. dos. Curso de epidemiologia básica para pneumologistas. 4ª parte - Epidemiologia clínica. **J. Pneumologia [online]**. vol.25, n.6, pp. 321-326. ISSN 1678-4642, 1999.

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

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; CAMPOS, F.R.; DEZEN, B.; ARAÚJO, M.; GENOVEZ, M.E. Discite em humano com brucelose: confirmação e identificação da espécie por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.3, p.1-4, 2003.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.209-227, 2002.

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

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

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. 4. ed. **Elsevier**: São Paulo. p.936-938, 2010.

NIELSEN, N.; SMITH, P.; YU ,W.L.; ELMGREN, C.; HALBERT, G.; NICOLETTI, P.; PEREZ, B.; CONDE, S.; SAMARTINO, L.; NICOLA, A.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, n.3-4, p.246-250, 2008.

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

NOGUEIRA, A.H.C.; FERRARI, C.I.L. ; CURCI, V.C.L.M. Brucelose ovina (*Brucella ovis*). São Paulo: **APTA REGIONAL**, 2006. Disponível em: <[http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/apta\\_brucelose\\_ovina.htm](http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/apta_brucelose_ovina.htm)>. Acesso em: 13/09/2015.

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 - Lista de enfermidades de declaração obrigatória a OIE (2006) disponível em:[http://www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification.htm](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm) Acesso em: 30 de setembro de 2015.

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

PAOLICCHI, F.A.; CASARO, P.A.; GIME O, EJ.; KORTEBANI, L.G.; MAZZOLLI, A.B., Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella* avis **Small Ruminant Res.**, v.36, p.7-15, 2000.

PAOLICCHI, F. Epididimitis ovina por *Brucella* avis: lesiones genitales y respuesta immune antiespermática. **Rev. Med. Vet.**, v.82, n.2, p. 86-88,2001.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada, 2003. Disponível em: <<http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>>. Acesso em 22 de Setembro de 2015.

PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; AGOTTANI, J.V.; JESUS, E.M.; ASSIS, S.T.; OLIVEIRA, C.Z. Ocorrência de ovinos sororeatores para *Brucella ovis* no Estado de Alagoas, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.3, p.500-508, 2009.

PUTINI, V. B.; CRUZ, R. B.; SANTANA, G. D. S.; JORGE, J.S, SILVA, D. L. D.; MOURA, M.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R.B. Padronização e avaliação da sensibilidade e especificidade de um teste elisa indireto para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno a cepa de *B. abortus* inativada. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 361-370, 2008.

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.

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 FILHOS, 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**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 211-213, 1966.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 48, p.57-59, 2000.

RIDLER, A.L; WEST, D.M. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. **New Zealand Veterinary Journal**, v.50, n.1, p.19-22, 2002.

ROBLES, C. A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 79, n. 1, p. 67-71, 1998.

ROBLES, C.A. Brucelosis de los carneros. **Rev. IDIA**, v.21, n.7, p.83-86, 2004. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/ovinos.htm>. Acesso em: 19/09/2015.

SAUNDERS, V.F.; REDDA CLIFF, L.A.; BERG, T.; HORNITZKY M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. **Australian Veterinary Journal**, v.85, n.1, p.72-77, 2007.

SHIN, S.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. In: Carmichael L.E. Recent advances in canine disease. **Internacional Veterinary Information Service**, New York. 1999.

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.; ANUNCIACÃO, 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.

SOUZA, T. S.; COSTA, J.N.; PINHEIRO, R.R.; MARTINEZ, P. M. 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.

SPENCER, T.L.; BURGESS, G.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.194-198, 1984.

TAMAYO, R. et al. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* em ovino de la X Region de Chile. **Archive Medicine Veterinary**, n.1., p.22-28, 1989.

TECPAR. Manual de instruções do teste de diagnóstico para *Brucella Ovis*. 2008.

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.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – WHO Autor principal: CORBEL, M. J. Brucellosis in humans and animals. Switzerland, p.19-28, 2006.

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

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.