

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslanados do Semi-Árido da Paraíba: sorologia, bacteriologia e Reação em Cadeia pela Polimerase.

Salomão Moreira de Figueiredo

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS – PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslanados do Semi-Árido da Paraíba: sorologia, bacteriologia e Reação em Cadeia pela Polimerase.

**Salomão Moreira de Figueiredo**

Graduando

Orientador: Prof. Dr. Clebert José Alves

Patos - PB

Julho de 2007

Fol 111  
2007



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO  
CAMPUS DE PATOS - UFCG

F475e  
2007

Figueiredo, Salomão Moreira.

Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslanados no Semi-Árido da Paraíba: sorologia, bacteriologia e Reação em Cadeia pela Polimerase. / Salomão Moreira de Figueiredo. – Patos: CSTR/UFCG, 2007.

28 p.

Inclui bibliografia.

Orientador: Clebert José Alves

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Brucelose - Ovino – Monografia. I – Título.

CDU: 616.981.42:636.3

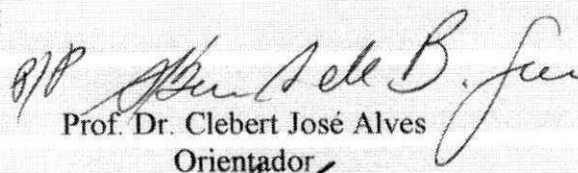
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS - PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

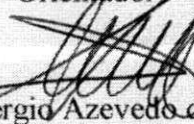
**Salomão Moreira de Figueiredo**  
Graduando

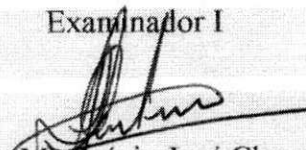
Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM: 27 / 07 / 2007

BANCA EXAMINADORA:

 Nota 10,0  
Prof. Dr. Clebert José Alves  
Orientador

 Nota: 10,0  
Prof. Dr. Sérgio Azevedo dos Santos  
Examinador I

 Nota: 10,0  
Méd. Vet. MSc. Inácio José Clementino  
Examinador II

## DEDICATÓRIA

*A Médica Veterinária Tássia Cortês uma das pessoas que mais me incentivou no meu crescimento profissional e pessoal.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, força contínua em minha vida;

Às pessoas que mais desejam o meu crescimento profissional e pessoal (Tia M<sup>a</sup> dos Anjos, Adauto Jr., meus pais e irmãos e demais familiares) que se esforçaram muito para me ajudar a atingir meus objetivos;

Aos amigos João Marcos, Ricardo, Silvano e Vasconcelo, pelos momentos de descontração;

A dona Francinete, técnica do Laboratório de Doenças Transmissíveis /UFCG/CSTR, pelo apoio;

A colega Carolina Américo, Médica Veterinária, pelo apoio durante meu estágio em São Paulo;

Ao Médico Veterinário, Inácio J. Clementino, pelo acompanhamento contínuo neste trabalho;

Aos doutores, Sérgio Azevedo, Albério Barros, Ednaldo Queiroga, Onaldo Guedes e demais professores da graduação do curso de Medicina Veterinária do CSTR;

Ao Prof. Dr. Clebert José Alves, meu orientador, pela paciência e apoio durante a minha caminhada acadêmica;

Ao Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Campus de Patos, pelo apoio laboratorial e ajuda com transporte durante a colheita de material;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Local do trabalho.....	13
2.2. Tamanho da amostra.....	14
2.3. Obtenção do material.....	15
2.3.1. Animais.....	15
2.3.2. Procedimentos de campo.....	15
2.3.2.1. Fase I: Realizada no Matadouro Público de Patos - PB.....	15
2.3.2.2. Fase II: Realizada nas propriedades com sorologia positiva para <i>B. ovis</i> .....	15
2.4. Procedimentos laboratoriais.....	16
2.4.1. Meio de cultura ágar- <i>Brucella</i> sangue.....	16
2.4.2 Prova de soroglutinação rápida com antígeno acidificado (Card Test).....	17
2.4.3. Teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....	17
2.4.3.1. Antígeno e soros controles.....	17
2.4.4. Teste de reação de polimerase em cadeia (PCR).....	18
2.4.4.1. Protocolo de extração do DNA de amostras de homogeneizados de órgãos ovinos..	18
2.4.4.2. Condições de Amplificação de Ácidos Nucléicos.....	19
2.4.5. Isolamento e identificação da <i>B. ovis</i> .....	20
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Mapa das regiões visitadas durante o projeto para a colheita do material (sêmen e soro sanguíneo) para isolamento e sorologia de <i>Brucella ovis</i> .....	14
<b>Figura 2</b>	Foto da extração do DNA de amostras de homogeneizados de órgãos ovinos.....	20
<b>Gráfico 1</b>	Resultado das amostras de soros sanguíneos de animais provenientes do Matadouro Público de Patos-PB, submetidos ao teste de IDGA para <i>B. ovis</i> .....	21
<b>Gráfico 2</b>	Resultados dos exames das amostras de soros sanguíneos de animais provenientes das propriedades visitadas durante o período de março à junho de 2006, submetidos ao teste de IDGA para <i>B. ovis</i> .....	21
<b>Tabela 1</b>	Resultado ao teste sorológico IDGA para <i>B. ovis</i> realizado durante o projeto feito no Matadouro Público de Patos – PB e nas propriedades visitadas, Patos, 2006.....	22
<b>Tabela 3</b>	Data e número de amostras de sêmen colhidas nas propriedades da mesorregião do Sertão Paraibano no período de março a junho de 2006.....	22

## RESUMO

**FIGUEIREDO, S. M. Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslanados no Semi-Árido da Paraíba: sorologia, bacteriologia e Reação em Cadeia pela Polimerase.** Patos, UFCG. 2007 28p. (Monografia – Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

Foi realizado um trabalho para isolamento de *Brucella ovis* em ovinos deslanados no semi-árido da Paraíba. Este foi dividido em duas fases: na fase I, realizada no Matadouro Público de Patos-PB, foram colhidas 64 amostras de testículos, epidídimos, glândulas vesiculares e ampolas do ducto deferente de carneiros e 16 úteros e/ou placentas de animais com ou sem alterações clínicas sugestivas de infecção por *B. ovis*; na fase II, foram visitadas 21 propriedades com histórico de sorologia positiva para *B. ovis*, onde foram colhidas amostras de sêmen. Nas duas fases, foram colhidas amostras de sangue dos animais. Foram realizados cultivo microbiológico, sorologia para *B. ovis* pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sorologia para *B. abortus* pela técnica do antígeno acidificado tamponado (AAT) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando *primers* gênero-específicos. Nas fases I e II, 6 (8%) e 1 (3%) animais foram soropositivos na IDGA, respectivamente. Não foram encontrados animais soropositivos para *B. abortus*. Colônias sugestivas de *B. ovis* foram isoladas de swab vaginal de uma ovelha soropositiva e DNA de *Brucella* spp. foi detectado em *pool* de amostras dos animais soropositivos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Brucella ovis*, ovinos, isolamento.

## ABSTRACT

**FIGUEIREDO, S. M. Brucellosis for *Brucella ovis* in sheep from Semi-Arid of Paraíba, Brazil: serology, bacteriology and Polymerase Chain Reaction.** Patos, UFCG. 2007 28p. (Monograph-Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health).

A work aiming to isolate *Brucella ovis* in sheep from semi-arid of Paraíba was conducted. It was divided in two phases: in phase I, accomplished at the Public Slaughterhouse of Patos-PB, 64 testicles, epididymides, vesicular glands and ampullae samples and 16 uterus and/or placental samples from animals with or without clinical alterations suggestive of *B. ovis* infection were collected. In phase II, 21 herds with previous relate of seropositivity for *B. ovis* were visited. In both phases, blood samples were collected. It were accomplished microbiological culture, serology for *B. ovis* by agar gel immunodifusion test (AGID), serology for *B. abortus* by Rose Bengal Test (RBT) and Polymerase Chain Reaction using genus-specific primers. In phases I and II, 6 (8%) e 1 (3%) animals were soropositive in AGID test, respectively. There were no soropositive animal for *B. abortus*. *B. ovis* sugestive colonies were isolated of vaginal swab from a seropositive ewe and *Brucella* spp. DNA was detected in pool of samples from the seropositive animals.

**KEY WORDS:** *Brucella ovis*, sheep, isolation.

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O rebanho ovino brasileiro é de 14 milhões de cabeças, das quais, 48,14% (6.617.980) estão na região Nordeste. Do efetivo ovino nordestino, 6,53% (438.430) encontram-se na Paraíba (IBGE, 1998). Grande parte das criações nordestinas de ovinos é apenas de subsistência, constituindo-se numa atividade de fundamental importância social e econômica, onde a produção de ovinos representa uma alternativa alimentar e de renda para os pequenos produtores rurais, contribuindo de forma significativa para a fixação do homem no campo (LEITE, 2003).

As raças deslanadas como a Santa Inês, Morada Nova e Somalis são as mais representativas no nordeste do país, devido a sua adaptação à região e seu desempenho produtivo satisfatório (BARROS et al., 2003). Deve-se ressaltar também a existência de produtores, na Paraíba, que trabalham com a seleção de animais da raça Santa Inês de alto padrão genético e valor econômico, chegando a serem vendidos reprodutores da região por mais de 180 mil reais (O BERRO, 2003).

A mortalidade perinatal de cordeiros é um dos fatores que limitam a eficiência biológica e econômica dos sistemas de produção ovina em todo o mundo, sendo suas causas inúmeras e variáveis, de rebanho para rebanho (RADOSTITS et al., 2002). Dentre os fatores responsáveis pela baixa produtividade no rebanho caprino e ovino, uma parcela de 10% tem sido atribuída ao abortamento, cujas principais causas são de origem sanitária e nutricional (SILVA et al., 1983). Na Paraíba, Clementino (2004 – comunicação pessoal), relatou que em média 39% dos criadores de ovinos relataram a ocorrência de abortamento, natimortidade e mortalidade de cordeiros na primeira semana pós-parto.

Apesar de não existirem, até o momento, estudos sobre as causas de abortamento e mortalidade perinatal em ovinos nos estados nordestinos, a brucelose ovina por *Brucella ovis* deve ser considerada uma das possíveis causas destes acontecimentos, uma vez que esta doença já foi relatada no Rio Grande do Norte (AZEVEDO et al., 1999; SILVA et al., 2003, Pernambuco (COLETO et al., 2003), e até na Paraíba (MEDEIROS, 2003; CLEMENTINO, 2005).

A brucelose ovina é uma doença infecciosa crônica dos ovinos causada pela *B. ovis* e caracterizada por vários graus de epididimite e orquite em carneiros; placentite, aborto e elevada mortalidade de cordeiros (NILO et al., 1986; HOMSE et al., 1995; BAIGÚN et al., 2000), tendo sido descrita em praticamente todos os países onde se explora a ovinocultura, sendo considerada uma das principais causas de perdas reprodutivas desta espécie animal,

advindas da redução da fertilidade dos rebanhos (PINOCHET et al., 1987; HOMSE et al., 1995).

O gênero *Brucella* é composto por coco-bacilos gram-negativos, aeróbicos, não cápsulados, imóveis e não formadores de esporos. Apesar de serem aeróbicos, algumas espécies exigem uma atmosfera com 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, bem como meios especiais de crescimento. Apresentam 0,5-0,7 μm de diâmetro e 0,6-1,5 μm de comprimento. Seis espécies são bem definidas: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotamae*, *B. ovis* e *B. suis*, sendo divididas em biotipos (*B. melitensis* - 3 biotipos; *B. abortus* - 9 biotipos e *B. suis* - 4 biotipos) - (ALTON et al., 1988; OIE, 2004).

A *B. ovis* infecta de forma natural exclusivamente à espécie ovina (HOMSE et al., 1995), sendo o macho mais suscetível que a fêmea (TAMAYO et al., 1989), existindo ainda diferença de suscetibilidade entre raças importadas e nativas (FICAPAL et al., 1998). O sêmen constitui a mais importante via de eliminação deste agente (BURGESS et al., 1982; WORTHINGTON et al., 1985; PLANT et al., 1986; BULGIN, 1990b; PAOLICCHI & LUQUEZ et al., 1993), sendo eliminado de forma intermitente (WORTHINGTON et al., 1985; PAOLICCHI & LUQUEZ et al., 1993) e por períodos prolongados, chegando a 80 semanas pós infecção (PAOLICCHI & LUQUEZ et al., 1993), sendo isolado, inclusive, do sêmen de carneiros soronegativos (BULGIN, 1990a).

Os ovinos são susceptíveis à *B. ovis*, que causa aborto no terceiro ou quarto mês de gestação (LYRA, 1984), artrites e epididimites, sendo esta última uma das principais causas de infertilidade em carneiros (KATOCH et al., 1996; MARINHO & MATHIAS, 1996; PINOCHET et al., 1987; SCHAFER et al., 1997), não sendo, no entanto, patogênica para o homem (COELHO et al., 1995).

As lesões produzidas pela *B. ovis* ocorrem no aparelho reprodutor como epidídimo aumentado de volume e endurecido, túnicas escrotais engrossadas e testículos geralmente atrofiados (SCHAFER et al., 1997). A contaminação de pastos e instalações pode ser responsável pela infecção. A bactéria penetra no organismo dos animais susceptíveis através das mucosas digestiva, peniana, retal, vaginal, conjuntival e pele lesada (OIE, 2004; LYRA, 1984), podendo permanecer nestes por um mês, devido a propriedade de resistir à destruição intrafagocitária, multiplicando-se lentamente. Após multiplicação nos gânglios regionais, as brucelas invadem os vasos linfáticos regionais e daí o ducto torácico e a corrente sanguínea. Disseminadas dessa maneira elas, eventualmente, vão se localizar em diferentes órgãos, tais como úbere, útero, baço, fígado e órgãos genitais do macho. Nas fêmeas, localizam-se particularmente no útero prenhe, causando aborto (REDWOOD & CORBEL, 1983).

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* tem sido feito, predominantemente, através de testes sorológicos, sendo que outros autores recomendam que o histórico do rebanho e o quadro clínico também sejam levados em consideração ao se interpretar o resultado dos testes sorológicos (MARINHO & MATHIAS, 1996).

Dentre as várias provas utilizadas no diagnóstico da brucelose ovina, destacam-se a fixação de complemento, o teste de imunodifusão em ágar gel e o teste de ELISA indireto (HILBINK et al., 1993; KUMAR et al., 1997; WEST et al., 1993). Alguns trabalhos realizados indicam uma maior capacidade de detecção do teste de ELISA indireto em relação às provas de fixação de complemento e imunodifusão em ágar gel (WORTHINGTON et al., 1984; WORTHINGTON et al., 1985; KUMAR et al., 1997), no entanto, a reação de fixação de complemento é a que apresenta resultados mais regulares e mais constantes (BURGESS & NORRIS, 1982; MARINHO & MATHIAS, 1996).

Em nosso meio, a técnica mais frequentemente utilizada é a imunodifusão em ágar gel (MYERS et al., 1972). Este teste apresenta sensibilidade e especificidade aceitáveis, sendo de fácil execução e interpretação, diferentemente das técnicas de ELISA indireto e fixação de complemento, que são extremamente laboriosas e exigem a disponibilidade constante de reagentes altamente lábeis (MARINHO & MATHIAS, 1996).

Worthington et al. (1984), investigando ovinos na Nova Zelândia, em condições experimentais, demonstraram, para as provas de fixação de complemento, ELISA indireto e imunodifusão em ágar gel, as sensibilidades de 96,3; 97,2 e 91,7% e as especificidades de 99,3; 98,6 e 100%, respectivamente.

Na maioria das vezes, para se confirmar um surto por *B. ovis*, é necessário isolar o agente para esclarecer a causa. Previamente ao isolamento, deve-se proceder à observação direta do agente, que pode ser feita através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada (WEST et al., 1993). A bactéria pode ser isolada de sêmen, de secreções vaginais de ovelhas que abortaram, de placenta ou de fetos abortados. Neste último caso, o material de eleição para o isolamento é o conteúdo do abomaso. As brucelas são bactérias exigentes, embora não apresentem dificuldades para seu isolamento e cultivo. A *B. ovis* exige CO<sub>2</sub> para crescimento; assim, deve-se proceder ao isolamento em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub> (MOLNAR et al., 1997; WEST et al., 1993; PAOLICCHI & LUQUEZ, 1993; WORTHINGTON et al., 1985). O agente cresce bem em ágar-sangue e em outros meios enriquecidos, mas frequentemente é necessário usar meios seletivos, por exemplo, contendo antibióticos (polimixina, bacitracina). Pode-se recorrer também à inoculação experimental em cobaia, eventualmente coelho e camundongo (MOLNAR et al., 1997).

A epididimite dos carneiros produzida por *B. ovis* tem sido descrita praticamente em todos os países onde se explora esta espécie animal (PINOCHET et al., 1987).

Recentemente, na província de Buenos Aires, Argentina, foi identificada uma elevada percentagem de carneiros excretando *B. ovis* pelo sêmen, com evidências sorológicas e em muitos casos sem sinais clínicos genitais (PAOLICCHI & LUQUEZ, 1993).

Kumar et al. (1997), investigando 225 ovinos na região de Punjab na Índia, constatou uma prevalência de 7,26 e 18,33% através dos testes de fixação do complemento e ELISA indireto, respectivamente.

No Brasil a doença foi descrita pela primeira vez em 1966 no Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1966), que detectaram epididimite clínica em 6,5% de 3.317 carneiros estudados. Em seguida, trabalhos de investigação sorológica foram publicados, mostrando que a infecção está difundida em vários estados do país, com prevalências variando de cinco a 35% (BOBLEL et al., 1972; MAGALHÃES-NETO & GIL-TURNES, 1996; AZEVEDO et al., 1999; COLETO et al., 2003; MEDEIROS, 2003; SILVA et al., 2003; NOZAKI et al., 2004; CLEMENTINO, 2005). Além disso, não existem, no país, relatos comprovando o isolamento da *B. ovis*.

Tendo em vista que a infecção por *B. ovis* já foi identificada através de vários testes sorológicos em vários estados brasileiros e que, apesar da infecção por esta bactéria fazer parte do Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004), não há relatos, no Brasil, comprovando o isolamento da *B. ovis*, portanto, foi estruturado o presente trabalho, para tentar isolar esta bactéria no semi-árido da Paraíba, uma vez que já há relatos sorológicos da sua presença no estado (CLEMENTINO, 2005).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do trabalho**

O trabalho de campo foi realizado no Matadouro Público de Patos-PB, e em propriedades localizadas nas mesorregiões do Sertão Paraibano e Borborema com sorologia positiva para *B. ovis*, conforme dados apresentados no trabalho de Clementino (2005). Foram coletadas 115 amostras de soro sanguíneo de animais, sendo 80 provenientes do Matadouro Público de Patos-PB e 35 das propriedade visitadas.



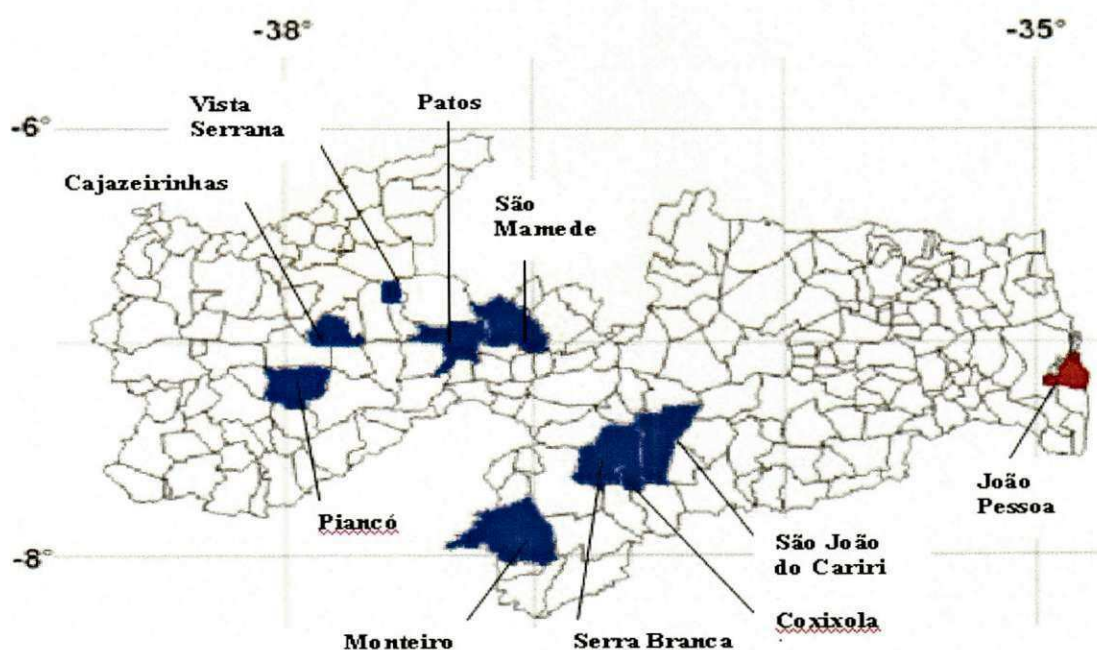
Os trabalhos laboratoriais foram feitos no Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande - PB (UFCG) em Patos.

Amostras suspeitas foram enviadas para tipificação na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VPS/FMVZ/USP) de São Paulo.

## 2.2. Tamanho da amostra

Fase I: Realizada com animais provenientes do Matadouro Público de Patos-PB. Foi utilizada uma amostragem não probabilística totalizando 80 amostras, sendo 64 carneiros e 16 ovelhas.

Fase II: Realizada em propriedades com sorologia positiva para *B. ovis*. Neste caso, foram utilizadas 21 das 25 propriedades, identificadas por Clementino (2005) com histórico de sorologia positiva para *B. ovis*, sendo 17 na mesorregião do Sertão Paraibano e oito na mesorregião da Borborema, nos municípios apresentados na Figura 1. Em cada propriedade, foram examinados os carneiros reprodutores, que apresentavam sorologia positiva identificados por Clementino (2005), ou na ausência destes, animais que tiveram contato direto e/ou indireto com os animais soropositivos.



**Figura 1:** Mapa das regiões visitadas durante o projeto para a colheita do material (sêmen e soro sanguíneo) para isolamento e sorologia de *B. ovis*.



## **2.3. Obtenção do material**

### **2.3.1. Animais**

Foram utilizados ovinos deslanados com e sem raça definida provenientes do Matadouro Público de Patos - PB e de propriedades com sorologia positiva para *B. ovis*, conforme dados apresentados por Clementino (2005).

### **2.3.2. Procedimentos de campo**

#### **2.3.2.1. Fase I - Realizada no Matadouro Público de Patos-PB**

A cada 15 dias eram feitas visitas ao matadouro e realizada uma inspeção dos carneiros a serem abatidos. Os animais não castrados que apresentaram alguma alteração do conteúdo escrotal foram marcados e, no momento da evisceração, foram coletados os testículos e epidídimos. Quinzenalmente eram coletadas amostras de quatro carneiros com alterações dos órgãos do conteúdo escrotal, na ausência destes, de animais sem alterações escrotais.

O mesmo procedimento foi realizado com as fêmeas, das quais foram coletados o útero e/ou placenta, priorizando-se as que estavam apresentando corrimento vaginal.

Todo o material coletado era colocado em recipiente estéril, acondicionado em isopor com gelo e enviado ao LDT/CSTR/UFCG onde foi processado.

Também foi colhido o sangue destes animais, o que se realizou por punção da veia jugular com seringas descartáveis. O sangue foi transferido para frascos estéreis, os quais foram enviados para o LDT/CSTR/UFCG, onde foi realizado o dessoramento e o congelamento das amostras a 20°C negativos, até o momento dos exames.

#### **2.3.2.2. Fase II - Realizada nas propriedades com sorologia positiva para *B. ovis***

Nestas propriedades foram feitos exames clínicos do trato reprodutivo dos carneiros reprodutores que apresentaram sorologia positiva na avaliação realizada por Clementino (2005). Na ausência destes animais foram utilizados carneiros que tiveram contato direto ou indireto com os soropositivos.

A avaliação clínica do conteúdo escrotal e a coleta de sêmen por eletroejaculação seguiram a metodologia descrita por Dirksen et al., (1993).

Para a tentativa de isolamento da *B. ovis*, uma alíquota do sêmen foi coletada em recipiente estéril. Também foram coletados *swabs* do colo uterino de ovelhas que apresentavam corrimento vaginal no momento da visita, que tivessem abortado e/ou placenta e fetos abortados.

Do total de animais trabalhados nesta fase, foram colhidas amostras de sangue para sorologia (Tabela 2).

**Tabela 2** - Data e número de amostras coletados no matadouro público de Patos para tentativa de isolamento de *B. ovis*.

DATA DAS COLETAS	Nº DE ANIMAIS	QUANT. DE AMOSTRAS TRABALHADAS				
		GLÂNDULA VESICULAR	ÂMPOLA	EPIDÍDIMO	TESTÍCULO	ÚTERO/ PLACENTA
16/09/05	06	05	05	05	05	01
30/09/05	05	04	04	04	04	01
28/10/05	05	04	04	04	04	01
18/11/05	05	03	03	03	03	02
25/11/05	07	06	06	06	06	01
16/12/05	05	04	04	04	04	01
10/02/06	11	08	08	09	09	02
24/02/06	09	08	08	07	07	01
28/04/06	11	09	09	09	09	02
05/05/06	10	08	08	08	08	02
12/05/06	06	04	04	04	04	02
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>16</b>

## 2.4. Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos de laboratório consistiram de: preparo dos meios de cultura para isolamento da *B. ovis* e todos os procedimentos necessários para sua identificação e realização dos testes de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico da infecção por *B. ovis* e AAT para detecção de infecção por *Brucella* *lisa*.

### 2.4.1. Meio de cultura Ágar-*Brucella* sangue

Esse meio, a base de Ágar-*Brucella*, é específico para o crescimento de Brucelas. O seu preparo seguiu a indicação do fabricante, sendo adicionado sangue desfibrinado de

carneiro na concentração de 5% do volume total do meio e o suplemento antibiótico comercial VCN\* para tornar o meio mais seletivo.

O meio foi distribuído em placas de Petri e, após a solidificação, acondicionado a 4°C.

#### **2.4.2. Prova de Soroaglutinação rápida com Antígeno Acidificado (Card Test)**

É uma prova qualitativa e não quantitativa, pois não determina a concentração de anticorpos no soro. Nesta reação participam as IgM e as IgG-1. O antígeno (Brucela lisa) utilizado, é corado com rosa bengala e acidificado (pH 3,65) o qual inativa as IgG-2. A leitura indica a presença ou ausência de IgG, pois somente esta classe de imunoglobulinas é capaz de reagir com este antígeno em função do pH baixo. Foi utilizado antígeno proveniente do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

#### **2.4.3. Teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA)**

O teste foi executado de acordo com a metodologia descrita por Worthington et al. (1984), onde foi utilizado Ágar Noble (Difco) na proporção de 1% em solução salina 0,85% estéril. As lâminas permaneceram em uma câmara úmida sob temperatura ambiente, durante 72 horas e as leituras foram feitas com intervalo de 24 horas.

A interpretação dos resultados dar-se-á pela observação de linhas de precipitação, agregação de antígenos e anticorpos, a qual forma-se entre os poços do antígeno e dos soros testados, a não formação desta linha implica na negatividade do animal pelo soro representado.

##### **2.4.3.1. Antígeno e soros controles**

Foi utilizado antígeno, que consiste de proteínas e lipopolissacarídeos extraídos da bactéria *B. ovis*, amostra Reo 198, e soros padrões positivo e negativo, provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

---

\* Produto fornecido pelo LABORCLIN

#### 2.4.4. Teste de reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS) do VPS/FMVZ/USP este foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por Richtzenhain et al. (2002).

##### 2.4.4.1. Protocolo de extração do DNA de amostras de homogeneizados de órgãos ovinos

O volume de amostra utilizado para extração de ácido nucléico foi de 500  $\mu$ L sendo a extração realizada da seguinte maneira:

- A. Lavagem da amostra: transferir 500 $\mu$ L para um microtubo, adicionar 500 $\mu$ L de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (Tris-HCl pH 8,0 10mM; EDTA 25mM, pH 8,0), agitar por 10 segundos em vórtex, centrifugar a 13.000g por 15 minutos, descartar o sobrenadante. Adicionar novamente 500 $\mu$ L de TE e repetir o procedimento mais uma vez.
- B. Terminada a lavagem, suspender o sedimento obtido em 400 $\mu$ L de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio SDS 1%; 10 $\mu$ L Proteinase K a 20mg/mL);
- C. Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) a 37°C por 24 horas sob agitação por 15 segundos a 1400g, a cada 15 minutos;
- D. Adicionar 500 $\mu$ L de fenol;
- E. Agitar por 10 segundos em vórtex;
- F. Centrifugar 13.000g por 5 minutos;
- G. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500 $\mu$ L;
- H. Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio;
- I. Agitar por 10 segundos em vórtex;
- J. Centrifugar 13.000g por 5 minutos;
- K. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500 $\mu$ L;
- L. Adicionar igual volume de propanol puro;
- M. Homogeneizar por inversão e manter a -20°C *overnight*;
- N. Centrifugar a 13.000g por 30 minutos;
- O. Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar 1000 $\mu$ L de etanol 70% a 5°C;

- P. Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Q. Centrifugar a 13.000g por 30 minutos;
- R. Descartar o sobrenadante por inversão;
- S. Secar o sedimento em termobloco sem agitação a 56°C por 10 minutos;
- T. Adicionar 30µL de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- U. Incubar em termobloco sem agitação a 56°C por 30 minutos;
- V. Estocar a -20 °C até realização da amplificação

#### 2.4.4.2. Condições de Amplificação de Ácidos Nucléicos

Foram empregados *primers* ITS66 (5' ACATAGATCGCAGGCCAGTCA 3') e ITS279 (5' AGATACCGACGCAAACGCTAC 3'), direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*. Os *primers* ITS66 e ITS279 amplificam um fragmento de 214bp e são específicos para bactérias do gênero *Brucella*.

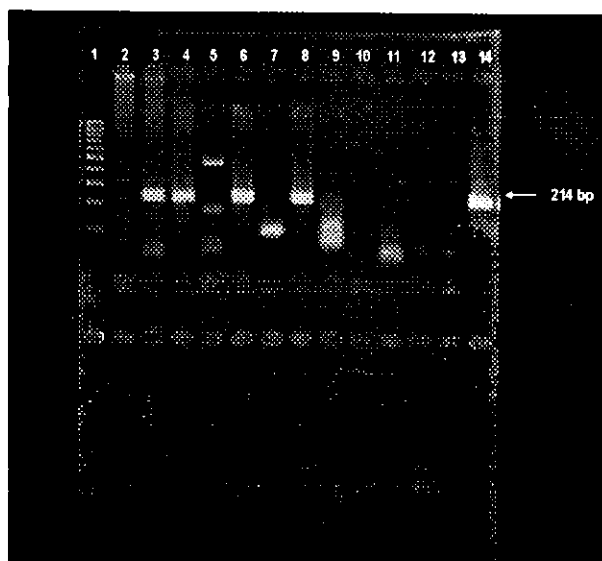
A reação de amplificação foi realizada num volume de 50 µL, contendo: 200 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 0,5µM de cada *primer*, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> 1,5 Unidades de *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 5 µL de DNA extraído (amostra) e água ultra pura.

O ciclo empregado foi realizado nas seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por dois minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e aquecimento final a 72°C por cinco minutos. O termociclador utilizado foi da marca MJ Research PTC-200 DNA Engine Version 3.0, Massachusetts, USA.

Foram realizadas duas amplificações subseqüentes, nas mesmas condições, para aumentar a sensibilidade da reação, por se tratar de um pool de amostras.

A análise do produto amplificado foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1ml EDTA, pH 8,0). O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V / cm. A imersão do gel numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 20 minutos e posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK et al., 1989). Estas foram comparadas com um padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produto amplificado de 214 bp (Figura 2).



**Figura 2:** Foto da extração do DNA de amostras de homogeneizados de órgãos ovinos.

#### **2.4.5. Isolamento e identificação da *B. ovis***

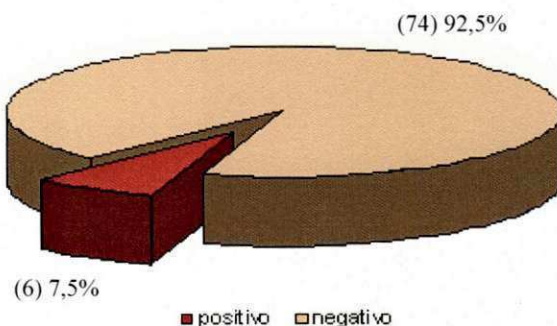
Para o isolamento, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar-*Brucella* sangue enriquecido com antibióticos. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante cinco dias, em uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>. As placas foram observadas diariamente para verificação do crescimento bacteriano. As colônias crescidas passavam por uma triagem através da confecção de esfregaços e sua coloração através da técnica de Ziehl Neelsen modificada (OIE, 2004).

### 3. RESULTADOS

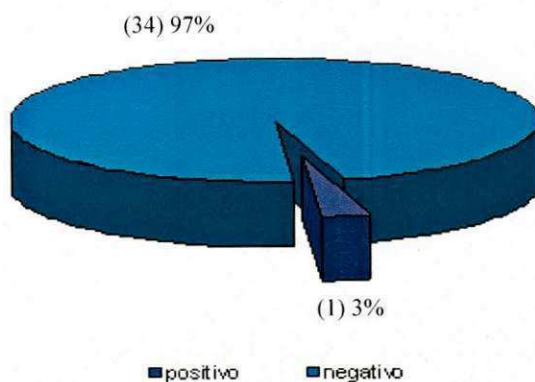
Os resultados obtidos a partir das amostras de soro de ovinos submetidas à Prova de soroaglutinação rápida com Antígeno Acidificado apresentou 100% de negatividade para *B. abortus*.

Uma amostra de útero (73) colhida no matadouro público de Patos-PB apresentou crescimento de colônias com características morfológicas compatíveis com *B. ovis*, o mesmo animal apresentou IDGA positivo para esta bactéria e AAT negativo para *B. abortus*. Esse material foi enviado, juntamente com outras amostras (08, 60, 62, 67, 79 e A102) que apresentaram sorologia positiva para *B. ovis*, porém sem crescimento microbiano, para a realização de PCR, o qual deu positivo para o gênero *Brucella*.

Destas, 6 (8%) e 1 (3%), respectivamente foram positivos para IDGA como observados nos gráficos 1 e 2 e Tabela 1.



**Gráfico 1:** Resultado das amostras de soros sangüíneos de animais provenientes do Matadouro Público de Patos-PB, submetidos ao teste de IDGA para *B. ovis*.



**Gráfico 2:** Resultados dos exames das amostras de soros sangüíneos de animais provenientes do Matadouro Público de Patos-PB, submetidos ao teste de IDGA para *B. ovis*.



**Tabela 1** - Resultado ao teste sorológico IDGA para *B. ovis* realizado durante o projeto feito no Matadouro Público de Patos – PB e nas propriedades visitadas, Patos, 2006.

IDGA	MATADOURO		PROPRIEDADES		TOTAL DE AMOSTRAS
	SEXO		SEXO		
	M	F	M	F	
POS	4 (5%)	2 (2,5%)	1 (3%)	0 (0%)	7 (6,08%)
NEG	60 (75%)	14 (17,5%)	18 (51%)	16 (46%)	108 (93,92%)
<b>TOTAL</b>	<b>80 (100%)</b>		<b>35 (100%)</b>		<b>115 (100%)</b>

Durante as visitas às propriedades foram colhidas 19 amostras de sêmen dos reprodutores através de eletroejaculador (Tabela 4) sendo posteriormente confeccionadas lâminas para coloração de Ziehl-Nielsen e também semeio em meios de cultivo para tentativa de isolamento de *B. ovis*, não sendo observado nenhum crescimento bacteriano com características morfotintórias semelhantes ao agente pesquisado.

**Tabela 3** - Data e número de amostras de sêmen colhidas nas propriedades da mesorregião do Sertão Paraibano no período de março a junho de 2006.

DATA DAS COLETAS	AMOSTRAS DE SÊMEN/ N° DE AMOSTRAS
17/03/06	09
16/05/06	04
25/05/06	04
09/06/06	02
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>

Em apenas uma propriedade o reprodutor foi o mesmo utilizado por Clementino (2005) em seu inquérito soroepidemiológico para *B. ovis*.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo não se observou nenhum animal reagente à prova de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para *B. abortus*. Resultados semelhantes foram observados por Marinho & Mathias (1996), no Estado de São Paulo.

Das 25 propriedades pesquisadas por Clementino (2005), que apresentaram animais reagentes à IDGA (teste de triagem), sendo assim consideradas como propriedades foco, foi encontrado apenas um reprodutor remanescente desta época. Desse modo houve



comercialização e/ou movimentação destes animais, o que representa um dado de importância epidemiológica, haja vista que são animais considerados fontes de infecção e que podem estar difundindo esta doença em outros rebanhos.

Os resultados obtidos revelaram 7/115 (6,09%) amostras positivas à IDGA para *B. ovis*, sendo 2 (28,57%) em fêmeas e 5 (71,43 %) em machos, dos quais, 2 (40%) dos positivos apresentavam lesões compatíveis com infecção por *B. ovis*, o que vem de encontro aos resultados obtidos por Robles et al. (1993), que verificaram 15 (4,3%) carneiros reagentes à IDGA, dos quais apenas 3 (20%) apresentavam lesões compatíveis com infecção por *B. ovis*, de um total de 345 animais investigados na Província de Chubut, Argentina. No trabalho desenvolvido por Nozaki et al. (2004) com 1033 amostras de soro sanguíneo de ovinos, de ambos os sexos, em 11 propriedades, de quatro municípios em São Paulo, obtiveram um percentual de 1,06% (11) animais positivos à IDGA, resultado este, inferior ao encontrado neste trabalho.

Dos cinco carneiros positivos à IDGA, dois apresentavam lesões testiculares. Deste material não houve crescimento. Em uma das duas fêmeas com sorologia positiva à IDGA houve crescimento de colônias bacterianas com características morfotinturiais semelhante à *B. ovis*. Essas colônias apresentaram-se como cocobacilos álcool-ácido resistentes quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Esta amostra, juntamente com um *pool* de outras amostras sem crescimento bacteriano e sorologia positiva à IDGA e negativa a AAT para *B. abortus* apresentaram PCR positivo para o gênero *Brucella*. Achados semelhantes foram encontrados por Niilo et al., (1986), onde não houve relação significativa entre os testes de Fixação do Complemento e ELISA em animais que apresentavam lesões escrotais, os quais também apresentaram-se negativos ao cultivo bacteriano. Dos 345 carneiros pesquisados por Robles et al., (1993), 34 apresentaram lesões no aparelho reprodutivo, sendo que apenas 3 (8,8%) apresentavam sorologia positiva em IDGA e lesões, concomitantemente.

As amostras de sêmen coletadas não apresentaram crescimento de colônias bacterianas álcool-ácido resistentes quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. Este resultado pode ser devido à eliminação intermitente deste agente através do sêmen (TURNES 2001).

Foi observado neste trabalho um maior grau de positividade ao teste de IDGA nos animais do Matadouro do que nas Propriedades. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que o matadouro é considerado um local de destino dos animais considerados improdutivos num rebanho. Sendo a brucelose por *B. ovis* uma importante causa de baixa na reprodutividade dos rebanhos ovinos.

## 5. CONCLUSÃO

Foram encontradas bactérias com características morfotinturiais semelhantes à *B. ovis* e animais com sorologia positiva à IDGA e negativos ao AAT para *B. abortus*, sendo que este material foi positivo para o gênero *Brucella* na PCR.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, G.G., L.M. JONES, R.D. ANGUS, J.M. VERGER. 1988. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 109p. 1988.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; SANTOS, F.A. Prevalência de ovinos reagentes à prova de imunodifusão em gel para *Brucella ovis* na microrregião do Seridó do Rio Grande do Norte. **In: IV CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA – ANAIS**, Recife, p. 269-270, 1999.
- BAIGÚN, R.; CONIGLIARO, A. S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. **Veterinaria Argentina**, v.17, n.162, p.103-7, 2000.
- BARROS, N.N.; SIMPLICIO, A.A.; CAVALCANTE, A.C.R.; BOMFIM, M.A.D. Influencia da raça Santa Inês sobre as características de carcaça de cordeiros da raça deslanadas. **In: V CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA - ANAIS**, Recife, 2003.
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.7, p.1-4, 1972.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 102 (PLANO NACIONAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA EPIDIDIMITE OVINA (*Brucella ovis*), publicada no Diário Oficial da União de 17/12/2004, Seção 1, p.24.
- BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.313-5, 1990a.
- BULGIN, M.S. *Brucella ovis* Epizootic in virgin ram lambs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.196, n.7, p.1120-2, 1990b.
- BURGESS, G.W.; McDONALD, J.W.; NORRIS M.J. Epidemiological studies no ovine brucellosis in selected ram flocks. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.45-7, 1982.
- BURGESS, G.W.; NORRIS, M.J. Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.23-5, 1982.
- CLEMENTINO, I.J. Comunicação pessoal. 2004.
- CLEMENTINO, I.J. **Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslanados do semi-árido da Paraíba. Inquérito soropidemiológico e fatores de risco associados à infecção**. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos-Paraíba. 2005.
- COELHO, L.M., MARTINS, L., EVANGELISTA, F. H. Prevalência de brucelose nos trabalhadores de matadouro em São Luís, estado do Maranhão. **R. Bras. Med. Vet**, 17(2): 85-88, 1995.
- COLETO, Z.F.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. et al. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do Estado de e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.3, p.551-3, 2003.

- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H-D.; STÖBER, M. **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 419p. 1993.
- 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.
- HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double immuno gel diffusion test and the enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. **New Zeland Veterinary Journal**, v.41, p.111-115, 1993.
- HOMSE, A.C.; CASARO, A.P.; CAMPERO, C.M. Infertilidad em ovelhas por *B. ovis*. **Veterinaria Argentina**, v.12, n.114, p.243-249, 1995.
- IBGE. Censo Agropecuário 1995-1996. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento e Orçamento, n.11-Paraíba, p.1-231, 1998.
- KATOCH, R.C.; JOSHI, V.B.; SHARMA, M.; BATTI, M.K.; NAGAL, K.B. Seroprevalence of *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, *chlamydia psittaci* in rams. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.66, n.11, p.1130-1131, 1996.
- KUMAR, P.; SINGH, D.K.; BARBEDDHE, S.B. Serological evidence of brucellosis in sheep and goats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.180-182, 1997.
- LEITE, E. R. **Plataforma Regional - Ovinocaprinocultura**, Sobral (CE), 11 de junho de 2003.
- LYRA, T.M.P. Epidemiologia da brucelose. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet Zootec. Univer. S. Paulo**, v.8, n.2, p.177-186, 1984.
- 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.
- 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.
- MEDEIROS, K. A. **Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella ovis* em reprodutores ovinos deslançados do semi-árido nordestino nos municípios de Patos e São Mamede-PB**. 2003. 17f. Monografia (Especialização em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. 2003.
- MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; TURY, E.; SOUSA, J.S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista brasileira de medicina veterinária**, v.19, n.4, p. 157-162, 1997.
- MYERS, D.M.; JONES, L.M.; VARELA-DIAZ, V.M. Studies of antigens of complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. **Appl. Microbiol.**, v.23, p.894-02, 1972.
- NILO, L.; MacDONALD, D.W.; GODKIN, G.F.; STONE, M.W. Ovine brucellosis in Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.27, p.245-249, 1986.
- NOZAKI, C.N.; MEGID, J.; LIMA, K.C.; SILVA JÚNIOR, 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**, v.71, n.1, p.1-5, 2004.

O BERRO. Edição 59, outubro de 2003.

OIE (Office Internacional de Epizootias). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, cap. 2.4.1 (OVINE EPIDIDYMITIS - *Brucella ovis*). Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00068.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00068.htm). Acesso em 12 de dezembro de 2004.

PAOLICCHI, F.A.; LUQUEZ, J.E. Efecto de oxitetraciclina de larga acción en el tratamiento de la infección com *Brucella ovis* en carneros. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.8, n.1, p.33-37, 1993.

PINOCHET, V.L.; PINTO, D'A. A.; SÁNCHEZ, M.L.; BERTOLINO, R.M. Brucelosis ovina. Vacunacion com cepa 45/20 adyuvante. **Avances em Ciências Veterinarias.**, v.2, n.1, p.47-50, 1987.

PLANT, J.W.; EAMENS, G.J.; SEAMAN, J.T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.12, p.409-412, 1986.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p. 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. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.1, p.211-213, 1966.

REDWOOD, D.W.; CORBEL, M.J.; Interaction of *Brucella ovis* with ovine tissue extracts. **The Veterinary Record**, v.113, p.220, 1983.

RICHTZENHAIN, L.J. et al.; A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87p. 139-147, 2002.

ROBLES, C.A.; LA TORRACA, A.; SANCHOLUZ, M.; UZAL, F. A; EVANS, E. Brucelosis ovina en majadas Merino de la provincia de Chubut, Argentina. **Vet Arg.**, v.10: p. 458-461, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold. Spring Harbor Lab. Press, 1989.

SCHÄFER, I., VAZ, A., RAMELLA, J., COUTINHO, G. Prevalência de carneiros reagentes à prova de imunodifusão em gel para *Brucella ovis* no Município de Lages-SC. **A Hora Veterinária**, v. 17, n. 99, p. 60-61, 1997.

SILVA, M.V.D.; SILVA, E.D.F. Possíveis causas de aborto em caprinos. **Comunicado Técnico**. EMBRAPA - Centro de Pesquisa de Caprinos. 12: 1-9, 1983.

SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, J.S. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal**, v.13, n.1, p. 51-4, 2003.

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

TURNES, C.G. Brucelose ovina. **In: RIET-CORREA, et al., Doença de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela, vol. 2, p. 197-205, 2001.

WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; ALLEY, M.R.; BADCOE, L.M.; HILBINK, E.; COMPTON, C.W.R. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. **New Zealand Veterinary Journal.**, v.41, p.82-86, 1993.

WORTHINGTON, R.W.; WEDDELL, W.; PENROSE, M.E. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **New Zealand Veterinary Journal.**, v.32, p.58-60, 1984.

WORTHINGTON, R.W., STEVENSON, B.J., 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.