



Universidade Federal
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA EPIDIDIMITE EM PEQUENOS
RUMINANTES: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.**

FABRINE ALEXANDRE DOS SANTOS

Patos – PB

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA EPIDIDIMITE EM PEQUENOS
RUMINANTES: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

FABRINE ALEXANDRE DOS SANTOS

Orientador: Prof. Titular Clebert José Alves

**Patos – PB
Março de 2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

- S237a Santos, Fabrine Alexandre dos
Aspectos epidemiológicos da epididimite em pequenos ruminantes:
isolamento, caracterização molecular e diagnóstico diferencial / Fabrine
Alexandre dos Santos. – Patos, 2018.
108f.
- Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de
Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.
- “Orientação: Prof. Titular Clebert José Alves.”
Referências.
1. Epididimite. 2. Actinobacillus seminis. 3. Inoculação experimental.
4. Métodos de diagnóstico. 5. Brucelose ovina. I.Título.

CDU 616:636.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FABRINE ALEXANDRE DOS SANTOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária.

APROVADO EM 24/03/2017

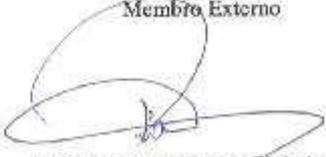
EXAMINADORES:


Prof. Titular Uelinton José Alves
Presidente (Orientador)


Prof. Dr. Alberio Antônio de Barros Gomes
Membro Externo


Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves
Membro Externo


Prof. Dr. Inácio José Clementino
Membro Externo


Dr. Raymundo Rivaldo Pinheiro
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

À Deus, ele que é o Grande Arquiteto Do Universo e que vem sempre projetando e guiando os meus passos, me dando saúde e forças para vencer cada dia as batalhas travadas no dia-a-dia.

Aos meus pais Francisca Alexandre e Francisco dos Santos, exemplos de família, por todo o amor e educação que sempre buscaram me dar.

Aos meus irmãos, Frank (o mais velho), Fabiano (meu conselheiro e amigo) e Francecirly (minha protegida, minha única irmã e por isso tenho maior zelo), pelo carinho, atenção e presença em todos os momentos dessa caminhada.

À minha “namorada” Elizeth Gomes, pelo estímulo, pela atenção, por sempre dizer palavras de estímulo e por ter me presenteado com a mais linda princesa dessa Terra, Maria Sophia.

Ao meu orientador, Prof. Titular Clebert José Alves, pela confiança depositada em mim desde a Iniciação Científica, por todos os ensinamentos e oportunidades.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Transmissíveis especialmente Diego, Leíse, Aline, Érico e dona Francinete por toda a ajuda prestada e pelos bons momentos de convivência.

Ao Prof. Titular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Renato de Lima Santos, por ter contribuído doando uma amostra de controle positivo de *Actinobacillus seminis*.

Ao Coordenador do NUPEÁRIDO Marcone Medeiros, pela doação dos animais e disponibilização de uma área na Fazenda para que fosse realizado o experimento.

Aos Pesquisadores da Embrapa Caprinos e Ovinos - Sobral-CE, Dr. Francisco Selmo e Dr. Raymundo Rizaldo e a orientada Ana Milena Cesar por toda a acolhida e ensinamentos.

Ao Prof. Titular Luís Antonio Mathias, Dra. Glaucenyra Cecília e toda equipe do Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose da Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal, por toda a amizade e conhecimentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) e ao secretário Jonas Alves de Oliveira por todo apoio para com todos os discentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

Esta tese é composta por três capítulos. No Capítulo I, foi realizada uma infecção experimental em dois caprinos (animais 1 e 2) e dois ovinos (animais 3 e 4) com uma cepa de *Actinobacillus seminis* isolada de caprino no Brasil. Foram utilizadas amostras de sêmen, punção e fragmentos de epidídimo, ducto deferente, testículos e glândulas seminíferas, para o exame histopatológico, cultivo microbiológico e diagnóstico molecular. Na avaliação clínica observou-se aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo do animal 4 que continuou até o dia da eutanásia, bem como o animal 1 apresentou discreto aumento unilateral dos testículos. As lesões macroscópicas e microscópicas observadas nos animais 3 e 4 foram compatíveis com aquelas causadas pela infecção por *A. seminis*. *A. seminis* foi isolado de material de punção, fragmento de testículo e sêmen de um ovino, animal 4. No Capítulo II, objetivou-se avaliar, experimentalmente em 15 caprinos, a patogenicidade do isolado denominado SAAS01 (*A. seminis*). Os animais foram analisados clinicamente no período de 12 semanas, e na ocasião foram feitas coletas de sêmen por eletro-ejaculação e a mensuração do diâmetro escrotal a cada 20 dias. Esses animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *A. seminis* (isolado SAAS01) pelas vias: intrapreucial, cauda do epidídimo e via conjuntival. Na avaliação clínica pode-se observar aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo dos animais 18, 51 e 57 que continuou até o dia da eutanásia. Os animais 51 e 57 apresentaram achados histopatológicos com alterações macroscopicamente e microscopicamente significativas. Foi possível o isolamento de colônias pequenas (1 a 2 mm), lisas, brilhantes e sem pigmento a partir de material de sêmen dos animais 18, 51 e 57 colhido na 3ª e 4ª coleta. Amplificou-se DNA de *A. seminis* a partir de sêmen dos animais 00, 12, 18, 22, 51 e 57, e de fragmentos de testículo dos animais 12 e 57. No Capítulo III, objetivou-se selecionar amostras de ovinos sorologicamente positivos no teste de IDGA, de ambos os sexos, e de vários estados do Nordeste (PI, CE, SE, PB, RN), sendo 130 do banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos provenientes dos animais testados (n= 2465 ovinos) e 41 do banco de soros do Laboratório de Doenças Transmissíveis do CSTR/UFCG (n= 1134 ovinos), totalizando 171 ovinos positivos, e se comparou com os testes de Fixação do Complemento (FC) e ELISA de competição. No teste de FC não se observou sorologia positiva, enquanto no ELISA quatro animais (2,33%) apresentaram-se soropositivos e 20 animais (11,69%) suspeitos.

Palavras-chave: Epididimite, *Actinobacillus seminis*, inoculação experimental, métodos de diagnóstico, Brucelose ovina, levantamentos sorológicos.

ABSTRACT

This thesis is composed by three Chapters. In Chapters I, the study was conducted experimental infection in two goats (animals 1 and 2) and two sheep (animals 3 and 4) with an *Actinobacillus seminis* strain isolated from goat in Brazil. Samples of semen, puncture and fragments of epididymis, deferent duct, testicles and seminal vesicles were used, and histopathological, microbiological culture and molecular diagnoses were performed. At clinical evaluation it were found unilateral swelling of firm consistency after 30 days in epididymis and testicle from animal 4 that continued until the day of euthanasia, as well as animal 1 shown discrete unilateral swelling of testicles. Gross and microscopic lesions in animals 3 and 4 were compatibles with that caused by *A. seminis* infection. *A. seminis* was isolated from material of puncture, testicle fragment and semen of one sheep (animal 4). In Chapter II, the objective of experimentally evaluate the pathogenicity of an isolate named SAAS01 in 15 goats. The animals were clinically analyzed over a 12-week period, during which time semen collections were performed by electroejaculation, and the scrotal diameter was measured every 20 days. These animals were challenged with 2 mL of a suspension containing 1.2×10^9 CFU/mL of *A. seminis* (SAAS01 isolate)¹⁶ by the following routes: intrapreputial, cauda epididymis, and conjunctival. In the clinical evaluation, a unilateral increase in firm consistency can be observed in the epididymides and testes of animals 18, 51, and 57 after 30 days; this firmness continued until the day of euthanasia. Animals 51 and 57 presented histopathological findings with macroscopically and microscopically significant changes. The isolation of small (1 to 2 mm), smooth, shiny, and pigment-free colonies was possible from the semen material collected from animals 18, 51, and 57 in the third and fourth collections. DNA of *A. seminis* was amplified from the semen of animals 00, 12, 18, 22, 51 and 57, and from testicular fragments from animals 12 and 57. In Chapter III, the objective of this work was to select samples from seropositive sheep in the AGIDA test, both sexes, and from several states of the Northeast (PI, CE, SE, PB, RN), of which 130 were from Embrapa Goat and Sheep serum bank (N = 2465 sheep) and 41 from the sera bank of the Laboratory of Communicable Diseases of the CSTR / UFCG (n = 1134 sheep), totaling 171 positive sheep, and compared with the Complement Fixation test (FC) and competition ELISA. In the FC test, no positive serology was observed, while in the ELISA-i four animals (2.33%) were seropositive and 20 animals (11.69%) suspected.

Key words: Epididymitis, *Actinobacillus seminis*, experimental inoculation, diagnostic methods, ovine brucellosis, herd screening.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. REFERÊNCIAS.....	14
3. CAPÍTULO I – Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em pequenos ruminantes experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i>.....	20
3.1. Abstract.....	21
3.2. Resumo.....	22
3.3. Introdução.....	22
3.4. Material e Métodos.....	23
3.5. Resultados.....	25
3.6. Discussão.....	26
3.7. Conclusões.....	28
3.8. Referências.....	28
4. CAPÍTULO II – Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em caprinos experimentalmente infectados com <i>Actinobacillus seminis</i>	35
4.1. Resumo.....	36
4.2. Introdução.....	37
4.3. Material e Métodos.....	37
4.4. Resultados.....	39
4.5. Discussão.....	41
4.6. Conclusões.....	43
4.7. Referências.....	43
5. CAPÍTULO III - Soroprevalência e comparação de técnicas sorológicas utilizadas no diagnostico da brucelose ovina no Brasil.....	50
5.1. Resumo.....	51
5.2. Abstract.....	52
5.3. Introdução.....	53
5.4. Material e Métodos.....	55
5.5. Resultados.....	56

5.6. Discussão.....	57
5.7. Conclusões.....	60
4.8. Referências.....	60
6. CONCLUSÕES.....	68
ANEXOS.....	69

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Resultados da inoculação experimental de amostra de <i>Actinobacillus seminis</i> (amostra SAAS01) isolada de caprino.....	34
--	----

CAPÍTULO II

Quadro 1. Resultados da inoculação experimental de amostra de <i>Actinobacillus seminis</i> (amostra SAAS01) isolada de caprino.....	49
--	----

CAPÍTULO III

Tabla 1. Prevalência de propriedades positivas (focos) e animais para a infecção por <i>Brucella ovis</i> em cinco Estados (PiauÍ, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe), da região do Nordeste do Brasil. entre os anos de 2010 a 2012.....	66
Tabla 2. Resultados da Sorologia para Brucelose ovina por diferentes técnicas diagnosticas.....	66
Tabla 3. Resultados da Sorologia para Brucelose ovina em diferentes Estados da região do Nordeste em função das técnicas diagnosticas.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Glândula seminal do animal 3 apresentando área de necrose central circundada por inflamação granulomatosa. OBJ. 20x. HE..... 32
- Figure 2. Glândula seminal do animal 3 apresentando material eosinofílico circundado por infiltrado inflamatório constituído por macrófagos epitelioides (cabeças de setas) e células gigantes multinucleadas (seta). OBJ. 40x. HE..... 32
- Figura 3. Corpo do epidídimo do animal 4 contendo infiltrados de neutrófilos, alguns degenerados e agregados bacterianos (seta) distendendo a luz do ducto com necrose epitelial focal (cabeça de seta) e neutrófilos intersticiais. OBJ. 20x. HE..... 33
- Figura 4. Análise de PCR para *A. seminis*. C- = controle negativo; M = marcador de tamanho molecular de 100 pb; 1 =, sêmen do animal 4; 2 = fragmento de testículo do animal 3; 3 = fragmento de testículo do animal 2; 4 = fragmento de testículo do animal 1; 5 = fragmento de epidídimo do animal 4; 6 = fragmento de epidídimo do animal 3; 7 = fragmento de epidídimo do animal 2; 8 = fragmento de epidídimo do animal 1; 9 = fragmento de glândula seminal do animal 4; 10 = fragmento de glândula seminal do animal 3; 11 = fragmento de glândula seminal do animal 2; 12 = fragmento de glândula seminal do animal 1; 13 = colônias de cultivo de material de punção testicular do animal 4; 14= fragmento da glândula seminal do animal 1; 15 = fragmento da glândula seminal do animal 2; C+ = controle positivo..... 33

CAPÍTULO II

- Figura 1. Observa-se aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo do animal 51..... 46
- Figura 2. Observa-se epididimite necrosante focal, com infiltrado inflamatório intersticial mononuclear acentuado. H.E, Barra= 100µm..... 47

Figura 3. Epidídimo – Há severa necrose do epitélio de revestimento dos ductos epididimários, intensa proliferação de tecido conjuntivo fibroso circunscrevendo os ductos, conjuntamente com discreto infiltrado de células mononucleares intersticiais. H.E, Barra= 200µm..... 48

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil conta hoje com um efetivo de aproximadamente 9.384.894 de caprinos e 17.662.201 de ovinos, dos quais a região Nordeste detém cerca de 90% (8.538.255) e 57% (10.110.352) desses efetivos, respectivamente (IBGE, 2011). Grande parte das criações nordestinas de ovinos é apenas de subsistência, considerando-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).

A Epididimite dos Carneiros é definida como o processo patológico, caracterizado por alterações inflamatórias, envolvendo o epidídimo dos reprodutores ovinos. A enfermidade está associada a inúmeros agentes microbianos, incluindo bactérias, vírus, micoplasmas e fungos (FERNANDES et al., 1967; BLOBEL et al., 1972; JANSEN, 1980; BAGLEY et al., 1984), tendo sido relatada como uma das principais causas de prejuízos econômicos, pois interfere na fertilidade dos machos infectados, que não são percebidos facilmente em criações extensivas devido a falta de informação dos produtores sobre essa doença (GOMES et al. 1991).

A brucelose ovina é uma doença infecciosa crônica dos ovinos causada pela *Brucella ovis* e caracterizada por vários graus de epididimite e orquite em carneiros; placentite e aborto em ovelhas e elevada mortalidade de cordeiros (NILO et al., 1986; HOMSE et al., 1995; BAIGÜN et al., 2000), tendo sido escrita 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).

A *Brucella ovis* infecta de forma natural exclusivamente à espécie ovina (HOMSE et al., 1995), sendo o macho mais susceptível que a fêmea (TAMAYO et al., 1989), existindo ainda maior 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 et al., 1993), sendo que sua eliminação ocorre de forma intermitente (WORTHINGTON et al., 1985; PAOLICCHI et al., 1993) e por períodos prolongados, chegando a 80 semanas pós infecção (PAOLICCHI et al., 1993), sendo isolado, inclusive, do sêmen de carneiros soronegativos (BULGIN, 1990a).

As lesões produzidas pela *B. ovis* ocorrem no aparelho reprodutor como epidídimo aumentado de volume e endurecido, as túnicas escrotais engrossadas e os testículos geralmente atrofiados (SCHAFER et al., 1997). Em ovinos, a contaminação de pastos e instalações pode ser responsável pela infecção. A bactéria penetra nos animais susceptíveis através das mucosas digestiva, peniana, retal, vaginal, a conjuntiva e a pele lesada (OIE, 2004; LYRA, 1984), podendo permanecer nelas 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 e CORBEL, 1983).

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, 1982; MARINHO e MATHIAS, 1996).

Em nosso meio, a técnica mais frequentemente utilizada é a imunodifusão em ágar gel (MYES 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 e 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 CO₂ para crescimento; assim, deve-se proceder ao isolamento em atmosfera contendo 10% de CO₂ (MOLNAR et al., 1997; WEST et al., 1993; PAOLICCHI e 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).

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

No Brasil a doença foi descrita pela primeira vez em 1996 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 prevalência variando de 5 a 35% (BOBLEL et al., 1972; MAGALHÃES-NETO e 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 *Brucella ovis*.

Outro agente envolvido com a epididimite é *Actinobacillus seminis*, uma bactéria Gram-negativa da família *Pasteurellaceae*. Esta infecção se estabelece quando os machos ainda jovens alcançam a maturidade sexual, também sendo diagnosticada em animais adultos. Sua patogenia é incerta, mas sugere-se que *A. seminis* seja um microrganismo oportunista presente na cavidade prepucial, capaz de colonizar as partes profundas do trato genital, ocasionando assim os sinais clínicos (DIBARRAT et al., 2006). Um dos possíveis fatores predisponentes pode estar associado ao estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual ou por deficiências nutricionais, ocasionando o desenvolvimento de orquite e epididimite, principalmente em carneiros jovens (HAJTÓS et al., 1987).

O primeiro isolamento de *Actinobacillus seminis* foi relatado por Baynes and Simmons (1960), na Austrália, de sêmen de ovinos com epididimite. A partir daí, a bactéria foi isolada em diversas ocasiões em vários países: USA (LIVINGSTON and HARDY, 1964), África do Sul (WORTHINGTON and BOSMAN, 1968), Nova Zelândia

(GUMBRELL and SMITH, 1974), Hungria (HAJTÓS et al., 1987), Argentina (ROBLES et al., 1990), Reino Unido (HEATH et al., 1991) e na Espanha (PUENTE-REDONDO et al., 2000). No Brasil, existem apenas quatro relatos sobre o isolamento de *Actinobacillus seminis* em ovinos (SCHREINERET al., 1992; GOMES et al., 2001; GREGORY et al., 2009; BEZERRA et al., 2012) e um em caprino (SANTOS et al., 2014). Clinicamente, a infecção por *A. seminis* caracteriza-se por alterações inflamatórias crônicas que envolvem o epidídimo e o testículo (BEZERRA et al., 2012). Deve ser destacado que as alterações clínicas estão associadas à baixa concentração e motilidade e a não viabilidade espermática, além da presença de neutrófilos no sêmen, que comprometem a taxa de fertilidade dos reprodutores, e nas regiões onde a doença não foi diagnosticada anteriormente, os prejuízos econômicos podem ser ainda maiores.

Tendo em vista que a Epididimite ovina provocada por *B. ovis* já foi identificada por vários testes sorológicos em diversos estados brasileiros e que, a infecção por esta bactéria faz parte do Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004) e considerando a necessidade do isolamento e caracterização molecular do agente e a hipótese de possíveis reações cruzadas nos testes sorológicos pela participação do *A. seminis* nos casos de epididimite ovina, estruturou-se o presente trabalho.

2. REFERÊNCIAS

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.

BAGLEY C.V., BURREL G.M., ESPLIN M.S. & WALTERS J.L. Effect of epididymitis on semen quality of rams. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 185:876-877, 1984.

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.

BAYNES I.D. & SIMMONS G.C. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* N. sp. **Australian Veterinary Journal**. v.36, p.454-459, 1960.

BEZERRA M. J. G., SANTOS A. S., CRUZ J. A. L. O., KUNG E. S., SÁ S. G., JABOUR F. F., BRITO M. F., MOTA R. A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.** v.32(5), p.369-373, 2012.

BLOBEL H., FERNANDES J.C.T., MIES FILHO A., RAMOS A.A. & TREIN E.J. Estudo sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Pesquisa Agropecuária Brasileira.7:1-4, 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.

BURGESS, G.W.; McDONALD, J.W.; NORRIS M.J. Epidemiological studies 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. **Brucelose por *Brucella ovis* em ovinos deslançados 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.

COLETO, Z.F.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. et al. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do Estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.3, p.551-3, 2003.

DIBARRAT JA, APARICIO ED, REYNOSO BA, APARICIO BD, GUTIÉRREZ VRT, PÉREZ, JT. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral com *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. **Rev. Téc. Pec. México**, v.44, p.257-267, 2006.

FERNANDES J.C.T., LOUZADA C.A.R., SILVA M. & SCHENCK J.A.P. Levantamento sorológico parcial da epididimite ovina no Rio Grande do Sul In: Anais SOVERGS. Porto Alegre. p.19, 1967.

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.

GOMES M.J.P. **Isolamento e identificação de *Chlamydia psittaci* de reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul.** Dissertação de Mestrado

em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ. 95p. 1991.

GOMES M.J.P., DRIEMEIER D., BONETTI A.L., EIDT M. & AZAMBUJA D.R. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis*, no Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS 29:55-58, 2001.

GREGORY L., RIZZO H.H., MEIRA JUNIOR E.B.S., LINS G.P.V. & PINHEIRO E.S. Relato do primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras. Reprod. Anim.** v.33(2), p.105-107. 2009

GUMBRELL R.C. & SMITH J.M.B. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine actinobacilli. **Journal General Microbiology.** v.84, p.399-402, 1974.

HAJTÓS I., FODOR L., GLÁVITS R. & VARGA J. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. **Journal of Veterinary Medicine, B.** v.34, p.138-147, 1987.

HEATH P.J., DAVIES I.H., MORGAN J.H. & AITKEN I.A. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in United Kingdom. **Veterinary Record.** v.129, p.304-307, 1991.

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. Produção Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, BRASIL.* 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm Acesso em: 14 fev. 2017.

JANSEN B.C. **The aetiology of ram epididymitis.** Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 47:101-107, 1980.

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.

LIVINGSTON C.W. & HARDY W.T. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. **American of Journal Veterinary Research.** v.25, p.660-663, 1964.

- 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.
- 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 for 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.
- OIE (Office Internacional de Epizootias). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, cap. 2.4.1 (OVINE EPIDIDYMITIS - *Brucella ovis*), disponível: 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 enfección 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 Ciencias 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.
- PUENTE-REDONDO DA, GARCÍA DEL BLANCO N, PÉREZ-MARTÍNEZ C, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ MC, RODRÍGUEZ-FERRI EF, GUTIÉRREZ-MARTÍN CB. 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.
- 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.
- ROBLES C.A., URCULLU J.A., UZAL F.A. & MERIO R. Primer diagnostico em Patagonia de orchideoepididimitis em carneros por bacilos pleomorficos Gram negativos. **Vet. Argent.** v.7, p.453-455, 1990.
- SANTOS F.A., AZEVEDO E.O., AZEVEDO S.S., GARINO JUNIOR F., MOTA R.A., KIM P.C.P., GOMES A. L. V., ALVES C.J. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 45, 1, 205-209, 2014.
- 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.
- SCHREINER E., GOMES M.J.P., CARDOSO M.I., FERNANDES J.C.T., HOPE L.P., LAITANO J.L.L. & FERNANDES R.E. Epididimite ovina: **Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul.** XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Gramado, RS, p.96. (Resumo) 1992.
- 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

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. & BOSMAN P.P. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. **Journal of South African Veterinary Medical Association.** v.39, p.81-85, 1968.

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.

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.

3. CAPÍTULO I

**ACHADOS MICROBIOLÓGICOS, MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICOS
EM PEQUENOS RUMINANTES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM
Actinobacillus seminis.**

Trabalho submetido à Revista
Pesquisa Veterinária Brasileira,
Seropédica – RJ. Qualis A2-JCR
0,538. Manuscrito em português.

Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em pequenos ruminantes experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis*¹

Fabrine A. Santos², Felício Garino Júnior², Pomy C.P. Kim³, Jean L. Araújo², Sergio S. Azevedo², Rinaldo A. Mota³, Antônio F.M. Dantas², Clebert J. Alves^{2*}

ABSTRACT.- Santos F.A., Garino Júnior F., Kim P.C.P., Araújo J.L., Azevedo S.S., Mota R.A., Dantas A.F.M. & Alves C.J. 2016. [**Microbiological, molecular and histopathological findings in small ruminants experimentally infected with *Actinobacillus seminis*.**] **Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em pequenos ruminantes experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis*.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mail: clebertja@uol.com.br

The aim of this study was to evaluate, in sheep, the pathogenicity of an *Actinobacillus seminis* strain isolated from a goat in Brazil. Samples of semen, puncture and fragments of epididymis, deferent duct, testicles and seminal vesicles from two sheep (animals 1 and 2) and two sheep (animals 3 and 4) were used, and histopathological, microbiological culture and molecular diagnoses were performed. The inoculum was prepared with saline solution at 10⁻² dilution corresponding to 1.0 McFarland standard, with *A. seminis* colonies previously cultured and administered on 2 mL volume by intra-preputial (animals 1 and 3) and epididymis tail (animals 2 and 4) routes. At clinical evaluation it were found unilateral swelling of firm consistency after 30 days in epididymis and testicle from animal 4 that continued until the day of euthanasia, as well as animal 1 shown discrete unilateral swelling of testicles. Gross and microscopic lesions in animals 3 and 4 were compatibles with that caused by *A. seminis* infection. *A. seminis* was isolated from material of puncture and semen of one sheep (animal 4). It is concluded that the experimental infection model using goats and sheep has proved the pathogenicity of the *A. seminis* strain isolated from a goat in the Brazilian semiarid and

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. *Autor para correspondência: clebertja@uol.com.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE 52171-900, Brasil.

reproduced in a sheep, which confirm the predilection of the agent for epididymis, with clinical signs, histopathological findings, bacterial isolation and positive molecular diagnosis.

INDEXING TERMS: Epididymitis, *Actinobacillus seminis*, experimental inoculation.

RESUMO.- O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade, em ovinos, de uma cepa de *Actinobacillus seminis* isolada de caprino no Brasil. Foram utilizadas amostras de sêmen, punção e fragmentos de epidídimo, ducto deferente, testículos e glândulas seminíferas de dois caprinos (animais 1 e 2) e dois ovinos (animais 3 e 4), e realizados exame histopatológico, cultivo microbiológico e diagnóstico molecular. O inóculo foi preparado com solução salina na diluição de 10^{-2} correspondendo ao padrão 1,0 da escala de McFarland, com colônias previamente cultivadas de *A. seminis* e administrado no volume de 2 mL pelas vias intra-prepucial (animais 1 e 3) e na cauda do epidídimo (animais 2 e 4). Na avaliação clínica observou-se aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo do animal 4 que continuou até o dia da eutanásia, bem como o animal 1 apresentou discreto aumento unilateral dos testículos. As lesões macroscópicas e microscópicas observadas nos animais 3 e 4 foram compatíveis com aquelas causadas pela infecção por *A. seminis*. *A. seminis* foi isolado de material de punção e sêmen de um ovino (animal 4). Conclui-se que o modelo de infecção experimental utilizando caprinos e ovinos comprovou a patogenicidade da amostra de *A. seminis*, isolada de um caprino no semiárido brasileiro e reproduzida em um ovino, comprovando a predileção do agente pelo epidídimo, com quadro clínico, achados histopatológicos, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Epididimite, *Actinobacillus seminis*, inoculação experimental.

INTRODUÇÃO

A epididimite ovina tem sido relatada como uma das principais causas de prejuízos econômicos, pois interfere na fertilidade dos machos infectados, de maneira que tais perdas não são percebidas facilmente em criações extensivas devido à falta de informação dos produtores sobre essa doença (Gomes et al. 1991). Um dos principais agentes causais é *Actinobacillus seminis*, uma bactéria Gram-negativa da família *Pasteurellaceae*, cuja infecção se estabelece quando os

machos ainda jovens alcançam a maturidade sexual, mas também diagnosticada em animais adultos. Clinicamente, a infecção por *A. seminis* caracteriza-se por alterações inflamatórias crônicas que envolvem o epidídimo e o testículo (Bezerra et al. 2012). A patogenia é incerta, mas sugere-se que *A. seminis* seja um micro-organismo oportunista presente na cavidade prepuccial capaz de colonizar as partes profundas do trato genital (Dibarrat et al. 2006). Um dos possíveis fatores predisponentes pode estar associado ao estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual ou por deficiências nutricionais, ocasionando o desenvolvimento de orquite e epididimite, principalmente em carneiros jovens (Hajtós et al. 1987).

O primeiro isolamento de *A. seminis* foi relatado por Baynes e Simmons (1960), na Austrália, em sêmen de ovinos com epididimite. A partir daí, a bactéria foi isolada de ovinos em diversas ocasiões em vários países: Estados Unidos da América (Livingston & Hardy 1964), África do Sul (Worthington & Bosman 1968), Nova Zelândia (Gumbrell & Smith 1974), Hungria (Hajtós et al. 1987), Argentina (Robles et al. 1990), Reino Unido (Heath et al. 1991) e Espanha (Puente-Redondo et al. 2000). No Brasil, existem apenas cinco relatos de isolamento de *A. seminis* em ovinos (Schreiner et al. 1992, Gomes et al. 2001, Gregory et al. 2009, Bezerra et al. 2012) e um em caprinos (Santos et al. 2014).

Tendo em vista que recentemente foi efetuado o primeiro isolamento de *A. seminis* em caprinos no Brasil (Santos et al. 2014), o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em ovinos, a patogenicidade da cepa (denominada SAAS01) isolada previamente em caprinos .

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Campina Grande através do protocolo CEP 249/2015.

Foram selecionados quatro animais, sendo dois caprinos (animais 1 e 2) e dois ovinos (animais 3 e 4), machos com idade de reprodução e clinicamente sadios. Os animais foram previamente testados para *Brucella ovis* pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com kits comerciais produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR, Curitiba, Brasil); a técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*, amostra Reo 198 onde todos os animais foram negativos na pesquisa de anticorpos anti-*B. ovis*.

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, em Patos, PB, Brasil. Os animais inicialmente foram adaptados em baias por período

de 15 dias e alimentados com feno de capim tifton e farelo de milho e trigo. Após esse período foram inoculados com *A. seminis* (amostra SAAS01) (Santos et al. 2014). O inóculo foi preparado com solução salina na diluição de 10^{-2} correspondendo ao padrão 1,0 da escala de McFarland, com colônias previamente cultivadas de *A. seminis* e administrado no volume de 2 mL por via intra-prepucial em dois animais, sendo um caprino e um ovino, e os dois animais restantes foram inoculados na cauda do epidídimo. Os animais foram analisados clinicamente por período de 90 dias, e na ocasião foram feitas punções na cauda do epidídimo e coleta de sêmen por eletro-ejaculação a cada três semanas, totalizando quatro coletas. Após o tempo proposto, os animais foram eutanasiados depois de serem sedados com xilazina (Copazine-Schering-Plough Coopers, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg de peso vivo e anestesia geral com tiopental sódico 2,5% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.) na dose de 10 mg/kg peso vivo, seguido por eletrocussão e submetidos à necropsia para coleta de fragmentos do epidídimo, ducto deferente, testículo e glândulas seminais. Essas amostras foram submetidas aos diagnósticos histopatológico, microbiológico e molecular. No momento da coleta do sêmen, foi utilizado eletro ejaculador específico para pequenos ruminantes com ondas e amplitudes padronizadas, gel lubrificante, sob orientação de especialistas em reprodução animal.

As amostras de tecidos e de sêmen foram semeadas nos meios ágar sangue e ágar *Brucella* enriquecidos com sangue desfibrinado de carneiro na concentração de 5% do volume total. Todas as amostras foram incubadas em atmosfera contendo 10% de CO₂ bem como em aerobiose por período de cinco dias. As bactérias isoladas foram submetidas às provas bioquímicas de catalase, oxidase, nitrato, esculina, motilidade, maltose, xilose, galactose, lactose, manose e trealose, conforme Krieg & Holt (1984). Para o diagnóstico histopatológico, as amostras foram fixadas em formalina a 10%, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo de 5 µm e as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Para o diagnóstico molecular por reação em cadeia pela polimerase (PCR), as amostras de sêmen, punção, fragmentos dos órgãos e cultivo foram submetidas à extração de DNA utilizando-se Kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®, Austin, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Os primers utilizados foram SRJAS1 (CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC) e SRJAS2 (AAGAAAAAGACGAAGAGACATT) segundo Appuhamy et al. (1998b), que amplificam fragmento com 436pb da região 16S do rRNA. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 12,5 µL contendo 2,5µL de DNA genômico; 0,5 µL de cada primer a 30µM; 2,5 µL de água ultrapura (Mili-Q®, Darmstadt, Alemanha) e 6,25 µL de Top Taq Master Mix (Qiagen®, Austin, EUA), de acordo

com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feito em termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO LTDA, Qingdao, China), consistindo de desnaturação do DNA inicial a 94°C (1 min) e seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 55°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 6 minutos para a extensão e extensão final de 1 minuto a 72°C, de acordo com Appuhamy et al. (1998a). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV.

RESULTADOS

No Quadro 1 estão apresentados os resultados de acordo com a espécie animal e via de inoculação. Na avaliação clínica observa-se aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo do animal 4 que continuou até o dia da eutanásia. O animal 1 também apresentou discreto aumento unilateral dos testículos aproximadamente no mesmo período. Já o animal 3 apresentou apenas achados histopatológicos e o animal 2 não apresentou alterações significativas.

Foi possível o isolamento de colônias pequenas (1 a 2 mm), lisas, brilhantes e sem pigmento a partir de material de punção e sêmen do ovino, animal 4, colhido na 3ª e 4ª coleta. Na coloração de Gram, foram identificadas bactérias com morfologia de bastonetes Gram negativas. O isolado foi catalase, oxidase, nitrato e esculina positivas e motilidade negativa, produção de ácido em maltose e xilose, sem produção de ácido em galactose, lactose, manose e trealose. As características morfotintoriais e bioquímicas permitiram identificá-lo como sendo *A. seminis*. Não houve crescimento bacteriano sugestivo de *A. seminis* em materiais dos animais 1, 2 e 3.

Na necropsia, foram observados aumento de volume unilateral da cauda, cabeça e corpo do epidídimo e pequeno foco de exsudato pastoso de cor branco acinzentado no animal 4. Já no animal 3, observou-se fibrose, atrofia e mineralização testicular e epididimal bilateral.

Ao exame histopatológico foi observada, no animal 3, área focal de necrose na glândula vesical contendo restos de espermatozoides e material eosinofílico circundado por intensa reação inflamatória granulomatosa (Fig. 1) constituída por macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas (Fig. 2), além de alguns linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos, limitada por cápsula de tecido conjuntivo fibroso. Algumas células gigantes apresentavam-se fagocitando o material eosinofílico e restos de espermatozoides. No animal 4 foi observada presença de infiltrado inflamatório multifocal na glândula vesical com número discreto de

neutrófilos, muitos degenerados, na luz das glândulas. Em algumas áreas esse infiltrado inflamatório foi observado na lâmina própria e entre as glândulas (intersticial), além de áreas de necrose epitelial. No corpo do epidídimo foi observada grande quantidade de neutrófilos, alguns degenerados, na luz do ducto epididimário. Em algumas áreas havia material finamente granular e basofílico característico de agregados bacterianos e infiltrado inflamatório neutrofilico com necrose focal do epitélio glandular (Fig. 3). No testículo, observaram-se áreas multifocais e discretas de necrose com raras células inflamatórias polimorfonucleares.

Foi amplificado DNA de *A. seminis* a partir de sêmen do animal 4. O produto amplificado da amostra revelou fragmento do tamanho indicado ao descrito para os primers utilizados para *A. seminis* (Fig. 4).

DISCUSSÃO

Clinicamente, a infecção por *A. seminis* caracteriza-se por alterações inflamatórias crônicas que envolvem o epidídimo e o testículo (Bezerra et al. 2012). Estas alterações foram devidamente comprovadas quando da avaliação clínica dos quatro animais reprodutores das espécies caprina e ovina, e o animal 4 apresentava quadro clínico de orquite e epididimite unilateral com consistência firme, achados confirmados também por Al-Katib & Denis (2007) e Moustacas et al. (2014) em trabalho de infecção experimental, que confirma a predileção do *A. seminis* pela cauda do epidídimo. Deve ser destacado que as alterações clínicas estão associadas à baixa concentração, baixa motilidade e a não viabilidade espermática, além da presença de neutrófilos no sêmen, que comprometem a taxa de fertilidade dos reprodutores, e em regiões sem histórico de diagnóstico da infecção os prejuízos econômicos podem ser ainda maiores devido à dificuldade de identificação dos sintomas.

Os achados relacionados às lesões macroscópicas observadas quando da necropsia do animal 4 vem ao encontro aos relatos descritos por outros autores, que descreveram lesões caracterizadas por aumento de volume da cauda do epidídimo, de um ou de ambos os testículos, mas a cabeça e o corpo também podem estar afetados, espessamento da túnica albugínea, epididimite, orquite, atrofia e diminuição na consistência testicular, além de abscessos na cauda do epidídimo (Al-Katib & Denis 2007, Moustacas et al. 2014), no testículo e no saco escrotal, exsudato purulento, pastoso ou granular, branco acinzentado, ou material calcificado pode ser encontrado unilateral ou bilateralmente (West 2004, Foster & Lads 2007, Moustacas et al. 2014). Ainda pode ser encontrado aumento dos linfonodos inguinais e ilíacos internos. O quadro de lesões deve ser considerado no diagnóstico das epididimites infecciosas agudas,

embora a sua etiologia só possa ser definida por meio do exame bacteriológico ou técnicas moleculares, pois outras bactérias podem causar lesões semelhantes (Bezerra et al. 2012). No animal 3, embora não tenha sido possível detectar a presença de isolados bacterianos, lesões como atrofia, fibrose e mineralização testicular e epididimal bilaterais são compatíveis com o quadro crônico da enfermidade, o que dificulta o isolamento bacteriano.

Na epididimite subaguda a crônica, as lesões histológicas causadas pelo *A. seminis* geralmente consistem de edema e fibrose intersticial do epidídimo, oclusão dos ductos epididimários com ausência de espermatozoides, reação inflamatória predominantemente linfoplasmocitária intersticial multifocal no testículo, mineralização de alguns túbulos seminíferos, necrose e inflamação piogranulomatosa no epidídimo e testículo, redução ou ausência de espermatozoides nos túbulos seminíferos, áreas de vacuolização do epitélio com pouca evidência de espermatogênese, além de atrofia tubular com retenção espermática e formação de granulomas (Baynes 1960, Tonder 1973, Puente-Redondo et al. 2000, Gomes et al. 2001, West 2004). Na infecção aguda, as lesões descritas por West (2004) correspondem a necrose, descamação do epitélio e alterações císticas dos túbulos da parte afetada do epidídimo, infiltração por neutrófilos, e alguns macrófagos e linfócitos, degeneração e necrose de neutrófilos e espermatozoides. Os achados microscópicos observados nos animais 3 e 4 estão semelhantes com os citados na literatura.

A ausência de crescimento bacteriano sugestivo para *A. seminis* em materiais dos animais 1, 2 e 3, a despeito que no animal 3 tenha sido possível verificar lesões como atrofia, fibrose e mineralização testicular e epididimal bilateral compatíveis com quadro crônico da enfermidade e no animal 1 a ausência de isolamento bacteriano, achados histológicos e amplificação de material genético em contra posição a presença de sinais clínicos, vem reforçar os achados de Moustacas et al. (2014) ao relatarem que houve baixa frequência de isolamento bacteriano a partir do sítio de inoculação e sugere que a cronicidade da infecção na cauda do epidídimo pode interferir na recuperação da bactéria.

Analisando-se os indicadores de produção, há relatos que revelam deficiências sanitárias em relação à criação de pequenos ruminantes na região semiárida do Nordeste do Brasil (Pinheiro et al. 2000), demonstrando a necessidade de minimização dos prejuízos provocados pelas perdas reprodutivas. Em particular, destacam-se as características da infecção por *A. seminis*, cujos efeitos não são perceptíveis nem mensuráveis (Gomes et al. 1991), especialmente em criações extensivas ou por produtores não alertados para a importância econômica da doença (Bezerra et al. 2012).

O isolamento de *A. seminis* em um animal experimentalmente inoculado com uma cepa

oriunda do primeiro isolamento em caprinos no Brasil (Santos et al. 2014), e confirmação por diagnóstico molecular se reveste de importância em função do que representa a atividade da caprinovincultura no contexto da cadeia produtiva e seus impactos econômicos para a região semiárida do Nordeste do Brasil, visto que a infecção foi reproduzida em ovino com cepa isolada de caprino. Diante disso, o *A. seminis* deve ser considerado como diagnóstico diferencial em casos de epididimite em pequenos ruminantes, especialmente na região Nordeste do Brasil, onde a criação consorciada de caprinos e ovinos é uma prática amplamente adotada e o agente já foi isolado em ovinos (Bezerra et al. 2012) e em caprinos (Santos et al. 2014), podendo ser esse modelo de criação decisivo na contaminação cruzada entre ovinos e caprinos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo de infecção experimental utilizando caprinos e ovinos comprovou a patogenicidade da amostra de *A. seminis*, isolada de um caprino no semiárido brasileiro e reproduzida em um ovino, comprovando a predileção do agente pelo epidídimo, com quadro clínico, achados histopatológicos, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.

Agradecimentos. - A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

- Al-Katib W. A. & Dennis S. M. 2007. Epididymal and testicular lesions in rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. N. Z. Vet. J. 55(3):125–129.
- Appuhamy S., Coote J.G. & Low J.C. 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. J. Clin. Microbiol. 36:814-817.
- Appuhamy S., Low J.C., Parton R. & Coote J.G. 1998. Specific PCR primers from the *Actinobacillus seminis*. J. Appl. Microbiol., 185:941-948.

- Baynes I.D. & Simmons G.C. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* N. sp. Aust. Vet. J. 36:454-459.
- Bezerra M. J. G., Santos A. S., Cruz J. A. L. O., Kung E. S., Sá S. G., Jabour F. F., Brito M. F. & Mota R. A. 2012. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. Pesq. Vet. Bras. 32(5):369-373.
- Brasil 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, SIDRA, 2012. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em 21 jun. 2012;
- Dibarrat J.A., Aparicio E.D., Reynoso B.A., Aparicio B.D., Gutiérrez V.R.T. & Pérez, J.T. 2006. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral com *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. Téc. Pecu. Méx. 44:257-267.
- Foster R.A. & Lads P.W. 2007. Male genital system. p.590-591. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds). Pathology of Domestic Animals, 5th ed. Saunders Elsevier, Toronto.
- Gomes M.J.P. 1991. Isolamento e identificação de *Chlamydia psittaci* de reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ. 95p.
- Gomes M.J.P., Driemeier D., Bonetti A.L., Eidt M. & Azambuja D.R. 2001. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis*, no Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS 29:55-58.
- Gregory L., Rizzo H.H., Meira Junior E.B.S., Lins G.J.V., Lins G.P.V. & Pinheiro E.S. 2009. Relato do primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim. 33(2):105-107.
- Gumbrell R.C. & Smith J.M.B. 1974. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine *Actinobacilli*. J. Gen. Microbiol. 84:399-402.
- Hajtós I., Fodor L., Glávits R. & Varga J. 1987. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. [Zentralbl Veterinarmed B](#) 34:138-147.
- Heath P.J., Davies I.H., Morgan J.H. & Aitken I.A. 1991. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in United Kingdom. Vet. Rec. 129:304-307.

- Krieg N.R. & Holt J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. P.660-663. In: Williams & Wilkins, Baltimore.
- Livingston C.W. & Hardy W.T. 1964. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. Am. J. Vet. Res. 25:660-663.
- Moustacas V.S., Silva T.M.A., Costa L.F., Carvalho Junior C.A., Santos R.L. & Paixão T.A. 2014. Clinical and Pathological Changes in Rams Experimentally Infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. Sci. World J. 2014:1-10.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G., Alves F.S.F. & Haddad J.P.A. 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52(5):534-543.
- Puente-Redondo D.A., García del Blanco N., Pérez-Martínez C., González-Rodríguez M.C., Rodríguez-Ferri E.F. & Gutiérrez-Martín C.B. 2000. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital Tract of Rams in Spain. J. Comp. Pathol. 122:217-222.
- Robles C.A., Urcullu J.A., Uzal F.A. & Merio R. 1990. Primer diagnostico em Patagonia de orchideoepididimitis em carneros por bacilos pleomorficos gram negativos. Vet. Argent. 7:453-455.
- Santos F.A., Azevedo E.O., Azevedo S.S., Garino Junior F., Mota R.A., Kim P.C.P., Gomes A. L. V. & Alves C.J. 2014. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. Braz. J. Microbiol. 45(1):205-209.
- Schreiner E., Gomes M.J.P., Cardoso M.I., Fernandes J.C.T., Hope L.P., Laitano J.L.L. & Fernandes R.E. 1992. Epididimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul. XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 1992, Gramado, RS, p.96. (Resumo).
- Sponenberg D.P., Carter M.E., Carter G.R., Cordes D.O., Stevens S.E. & Veit H.P. 1983. Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182:990-991.
- Tonder E.M.V. 1973. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. J. South African Vet. Med. Assoc. 44:235-240.
- West D.M. 2004. Gram-negative pleomorphic infections: *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* and *Haemophilus somni*. P.1655-1660. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), Infectious Diseases of Livestock. Vol.3. Oxford University Press. Oxford.
- Worthington R.W. & Bosman P.P. 1968. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. J. South Africa Vet. Assoc. 39:81-85.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Glândula seminal do animal 3 apresentando área de necrose central circundada por inflamação granulomatosa. OBJ. 20x. HE.

Fig. 2. Glândula seminal do animal 3 apresentando material eosinofílico circundado por infiltrado inflamatório constituído por macrófagos epitelioides (cabeças de setas) e células gigantes multinucleadas (seta). OBJ. 40x. HE.

Fig. 3. Corpo do epidídimo do animal 4 contendo infiltrados de neutrófilos, alguns degenerados e agregados bacterianos (seta) distendendo a luz do ducto com necrose epitelial focal (cabeça de seta) e neutrófilos intersticiais. OBJ. 20x. HE.

Fig. 4. Análise de PCR para *A. seminis*. C- = controle negativo; M = marcador de tamanho molecular de 100 pb; 1 =, sêmen do animal 4; 2 = fragmento de testículo do animal 3; 3 = fragmento de testículo do animal 2; 4 = fragmento de testículo do animal 1; 5 = fragmento de epidídimo do animal 4; 6 = fragmento de epidídimo do animal 3; 7 = fragmento de epidídimo do animal 2; 8 = fragmento de epidídimo do animal 1; 9 = fragmento de glândula seminal do animal 4; 10 = fragmento de glândula seminal do animal 3; 11 = fragmento de glândula seminal do animal 2; 12 = fragmento de glândula seminal do animal 1; 13 = colônias de cultivo de material de punção testicular do animal 4; 14= fragmento da glândula seminal do animal 1; 15 = fragmento da glândula seminal do animal 2; C+ = controle positivo.

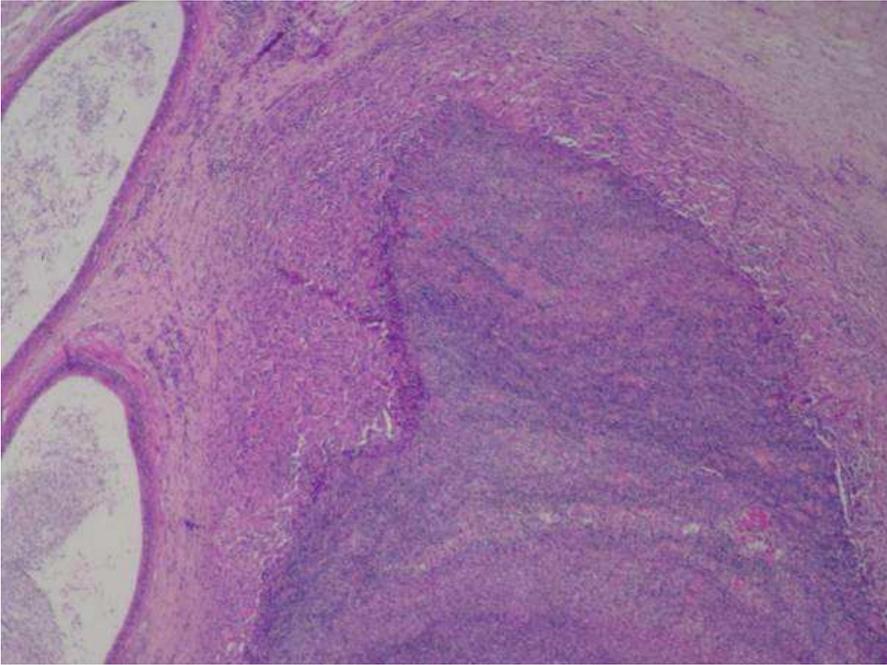


Fig. 1

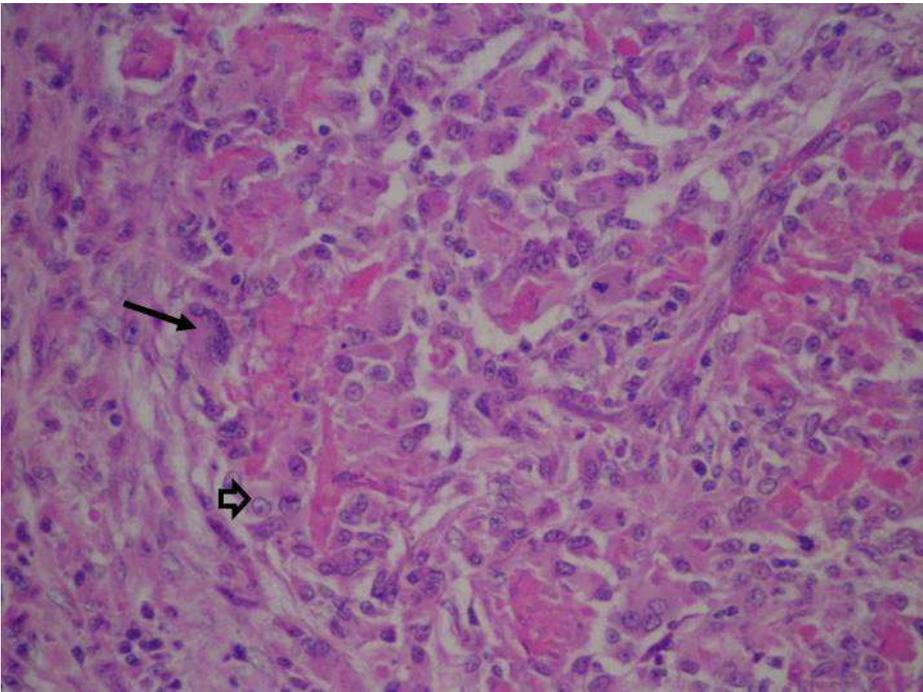
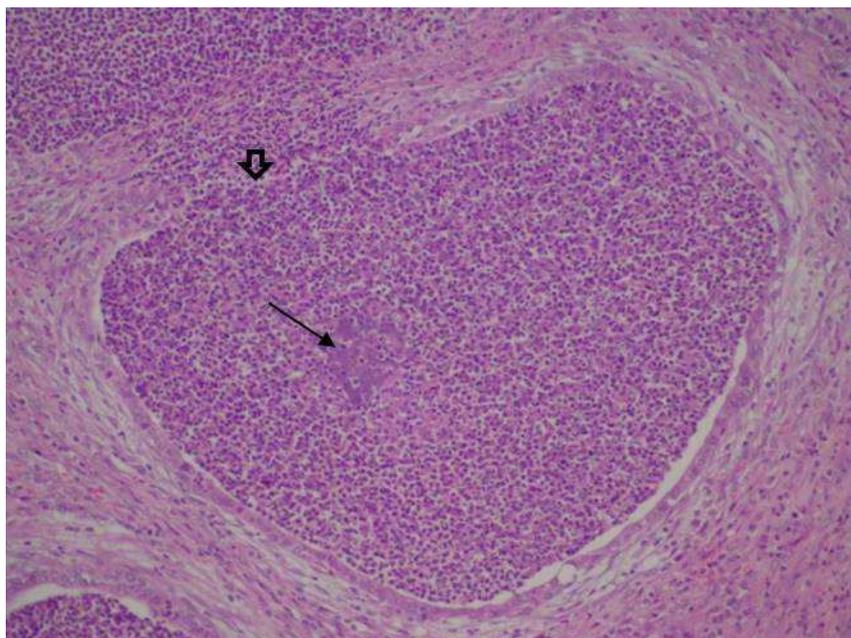
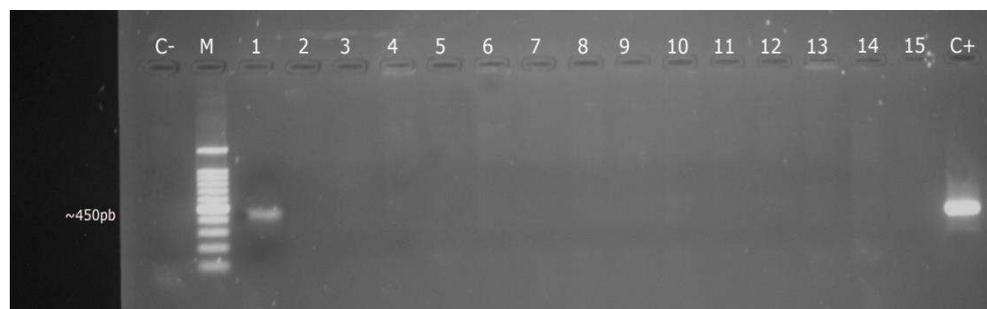


Fig. 2

**Fig. 3****Fig. 4**

Quadro 1. Resultados da inoculação experimental de amostra de *Actinobacillus seminis* (amostra SAAS01) isolada de caprino

Identificação do animal	Espécie	Via de inoculação	Sinais clínicos	Cultivo e isolamento	Achados histopatológicos	PCR
1	Caprino	Intra-prepucial	+	-	-	-
2	Caprino	Cauda do epidídimo	-	-	-	-
3	Ovino	Intra-prepucial	-	-	+	-
4	Ovino	Cauda do epidídimo	+	+	+	+

4. CAPÍTULO II

ACHADOS MICROBIOLÓGICOS, MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICOS EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Actinobacillus* *seminis*

“Microbiological, molecular, and histopathological findings in goats experimentally
infected with *Actinobacillus seminis*”

Trabalho submetido à Revista
Brazilian Journal of
Microbiology - SP. Qualis A2-
JCR 0.865. Manuscrito em
inglês.

**Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em caprinos
experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis***

Fabrine A. Santos^a, Diego Figueiredo da Costa^a, Aline Ferreira da Silva^a, Rosa Maria dos Santos Pessoa^c, Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha^b, Robério Gomes Olinda^d Antônio F.M. Dantas^d, Marcia Almeida de Melo^d, Carlos E. Peña Alfaro^d, Sergio S. Azevedo^d, Clebert J. Alves^{d*}

^aAlunos do Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brazil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), Faculdade de Medicina Veterinária, Sousa, PB, Brazil

^cAluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Patos, PB, Brazil

^dDocentes Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brazil

RESUMO.- O objetivo deste trabalho foi avaliar, experimentalmente em 15 caprinos, a patogenicidade do isolado denominado SAAS01. Os animais foram analisados clinicamente no período de 12 semanas, e na ocasião foram feitas coletas de sêmen por eletro-ejaculação e a mensuração do diâmetro escrotal a cada 20 dias. No final do período experimental os animais foram eutanasiados. Amostras foram submetidas aos diagnósticos histopatológico, microbiológico e molecular. Esses animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *A. seminis* (isolado SAAS01) pelas vias: intraprepucial, cauda do epidídimo e via conjuntival. Na avaliação clínica pode-se observar aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo dos animais 18, 51 e 57 que continuou até o dia da eutanásia. Os animais 51 e 57 apresentaram achados histopatológicos com alterações macroscopicamente e microscopicamente significativas. Foi possível o isolamento de colônias pequenas (1 a 2 mm), lisas, brilhantes e sem pigmento a partir de material de sêmen dos animais 18, 51 e 57 colhido na 3^a e 4^a coleta. Amplificou-se DNA de *A. seminis* a partir de sêmen dos animais 00, 12, 18, 22, 51 e 57, e de fragmentos de testículo dos animais 12 e 57. Conclui-se que o modelo de infecção experimental utilizando caprinos, comprovou a patogenicidade do isolado de *A. seminis*, demonstrando a predileção do agente pelo epidídimo, com evidência de sinais clínicos, lesões

histopatológicas, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Epididimite, *Actinobacillus seminis*, inoculação experimental.

INTRODUÇÃO

As doenças de origem microbianas do sistema genital dos machos em pequenos ruminantes têm um risco de incidência pequena. No entanto, seu impacto pode ser enorme, especialmente se eles não são diagnosticados a tempo.¹

A epididimite ovina tem sido relatada como uma das principais causas de prejuízos econômicos em todo o mundo, pois interfere na fertilidade dos machos infectados, de maneira que tais perdas não são percebidas facilmente em criações extensivas devido à falta de informação dos produtores sobre essa doença.^{2, 3} Um dos principais agentes causais é *Actinobacillus seminis*, uma bactéria Gram-negativa da família *Pasteurellaceae*, cuja infecção se estabelece quando os machos ainda jovens alcançam a maturidade sexual, mas também diagnosticada em animais adultos. Clinicamente, a infecção por *A. seminis* caracteriza-se por alterações inflamatórias crônicas que envolvem o epidídimo e o testículo.⁴ A patogenia é incerta, mas sugere-se que *A. seminis* seja um micro-organismo oportunista presente na cavidade prepucial capaz de colonizar as partes profundas do trato genital.⁵ Um dos possíveis fatores predisponentes pode estar associado ao estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual ou por deficiências nutricionais, ocasionando o desenvolvimento de orquite e epididimite, principalmente em carneiros jovens.⁶ O primeiro isolamento de *A. seminis* foi relatado por Baynes e Simmons et al.,⁷ na Austrália, em sêmen de ovinos com epididimite. A partir daí a bactéria foi isolada de ovinos em diversas ocasiões em vários países: Estados Unidos da América,⁸ África do Sul,⁹ Nova Zelândia,¹⁰ Hungria,⁶ Argentina,¹¹ Reino Unido¹² e Espanha.¹³ No Brasil, existem apenas cinco relatos de isolamento de *A. seminis* em ovinos,^{14,2,15,4} e um em caprinos.¹⁶ Tendo em vista que Santos et al.¹⁶ obteve o primeiro isolamento de *A. seminis* em caprinos no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, experimentalmente em 15 caprinos, a patogenicidade do isolado (denominada SAAS01).

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de

Campina Grande através do protocolo CEP 249/2015.

Foram selecionados 15 animais machos com idade de reprodução e clinicamente saudáveis. Os animais foram previamente testados para *Brucella ovis* pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com kit comercial produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR, Curitiba, Brasil); a técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*, amostra Reo 198 onde todos os animais foram negativos na pesquisa de anticorpos anti-*B. ovis*.

O experimento foi realizado na Fazenda Lameirão pertencente à Universidade Federal de Campina Grande, localizada no município de Santa Terezinha, PB, Brasil. Os animais inicialmente foram desverminados e adaptados em piquetes por período de 15 dias, alimentados com pastagem nativa como volumoso e farelo de milho e trigo como concentrado. Após o período de adaptação, os animais foram divididos em três grupos contendo cinco animais cada. No primeiro grupo, três animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de *A. seminis* (isolado SAAS01)¹⁶ por via intrapreputal e dois foram desafiados pela mesma via com solução salina estéril sendo utilizado como controle. No segundo grupo, três animais foram desafiados com 2 mL de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC/mL do mesmo isolado na cauda do epidídimo esquerdo e dois foram desafiados pela mesma via com solução salina estéril sendo utilizado como controle. No terceiro grupo, três animais foram desafiados com 50 μ L de suspensão contendo $1,2 \times 10^9$ UFC do mesmo isolado, no saco conjuntival esquerdo e dois foram desafiados pela mesma via com solução salina estéril sendo utilizado como controle. Antes da inoculação, todos os reprodutores caprinos foram submetidos à coleta de soro sanguíneo e sêmen com a finalidade de demonstrar a ausência de infecção pré-inoculação, também estavam clinicamente saudáveis, sem lesões palpáveis nos testículos ou epidídimos. Os animais foram analisados clinicamente por período de 12 semanas, e na ocasião foram feitas coletas de sêmen por eletro-ejaculação e mensuração do diâmetro escrotal a cada 20 dias, totalizando cinco coletas, a partir do dia zero. As análises do perímetro escrotal foram realizadas usando a média da variação da largura testicular entre a primeira e a última coleta nos três grupos experimentais, onde foi utilizado o pacote estatístico In Stat 3, com o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls a 5% de significância. No final do período experimental os animais foram eutanasiados, com protocolo anestésico de sedação com xilazina (Copazine-Schering-Plough Coopers, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg de peso vivo e anestesia geral com tiopental sódico 2,5% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.) na dose de 10 mg/kg peso vivo, seguido por eletrocussão e

submetidos à necropsia para coleta de fragmentos do corpo e cauda do epidídimo, ducto deferente, testículo e glândulas seminais. Essas amostras foram submetidas aos diagnósticos histopatológico, microbiológico e molecular. No momento da coleta do sêmen, foi utilizado eletro-ejaculador específico para pequenos ruminantes com ondas e amplitudes padronizadas, gel lubrificante, sob orientação de especialistas em reprodução animal.

As amostras de tecidos e de sêmen foram semeadas nos meios ágar sangue e ágar *Brucella* enriquecidos com sangue desfibrinado de carneiro na concentração de 5% do volume total. Todas as amostras foram incubadas em atmosfera contendo 10% de CO₂ bem como em aerobiose por período de cinco dias. As bactérias isoladas foram submetidas às provas bioquímicas de catalase, oxidase, nitrato, esculina, motilidade, maltose, xilose, galactose, lactose, manose e trealose, conforme Krieg & Holt.¹⁷ Para o diagnóstico histopatológico, as amostras foram fixadas em formalina a 10%, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo de 5 µm e as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Para o diagnóstico molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras de sêmen, punção, fragmentos dos órgãos e cultivo foram submetidas à extração de DNA utilizando-se Kit comercial “Qiagen DNA EasyBloodandTissues Kit” (Qiagen®, Austin, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Os primers utilizados foram SRJAS1 (CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC) e SRJAS2 (AAGAAAAGACGAAGAGACATT) segundo Appuhamy et al.,¹⁸ que amplificam fragmento com 436pb da região 16S do rRNA. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 12,5 µL contendo 2,5µL de DNA genômico; 0,5 µL de cada primer a 30µM; 2,5 µL de água ultrapura (Mili-Q®, Darmstadt, Alemanha) e 6,25 µL de Top Taq Master Mix (Qiagen®, Austin, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foi feito em termociclador XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO LTDA, Qingdao, China), consistindo de desnaturação do DNA inicial a 94°C (1 min) e seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 55°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 6 minutos para a extensão e extensão final de 1 minuto a 72°C, de acordo com Appuhamy et al. .¹⁹ Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV.

RESULTADOS

Não houve reação para infecções com *B. ovis* pelo teste de IDGA na primeira (pré-

inoculação) e segunda coleta. Porém, foi observado animais reagentes na terceira coleta (12 e 22), quarta coleta (18 e 14) e quinta coleta (51, 18, 57, 12 e 00).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de acordo com a identificação do animal e via de inoculação. Na avaliação clínica pode-se observar aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo dos animais 18, 51 (Fig. I) e 57 que continuou até o dia da eutanásia. Os animais 51 e 57 apresentaram achados histopatológicos com alterações macroscopicamente e microscopicamente significativas.

Foi possível o isolamento de colônias pequenas (1 a 2 mm), lisas, brilhantes e sem pigmento a partir de material de sêmen dos animais 18, 51 e 57 colhido na 3ª e 4ª coleta. Na coloração de Gram, foram identificadas bactérias com morfologia de bastonetes Gram negativas. O isolado foi catalase, oxidase, nitrato e esculina positivas e motilidade negativa, produção de ácido em maltose e xilose, sem produção de ácido em galactose, lactose, manose e trealose. As características morfotintoriais e bioquímicas permitiram identificá-lo como sendo *A. seminis*. Não houve crescimento bacteriano sugestivo de *A. seminis* em materiais dos demais animais.

Em dois animais (51 e 57) verificou-se no epidídimo esquerdo, aumento de tamanho, com focos amarelados e preenchidos com conteúdo viscoso amarelado, (exsudado purulento) circundados por cápsula de tecido fibroso. Ao exame histopatológico do epidídimo foi observado em dois animais (51 e 57) focos de necrose central circunscrita por marcada inflamação piogranulomatosa (Fig. II), composta predominantemente por neutrófilos, macrófagos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Além de linfócitos e plasmócitos em meio há abundante tecido conjuntivo que rodeava a reação granulomatosa. Havia ainda, necrose do epitélio dos ductos epididimários (Fig. III), ocasionais células gigantes multinucleadas, fagocitando material eosinofílico e espermatozoides degenerados intraluminal. No testículo, observaram-se focos de degeneração do epitélio seminífero e ocasionais áreas multifocais e discretas de necrose associada a infiltrado inflamatório de polimorfonucleares. No intersticial foi observado infiltrado inflamatório misto multifocal discreto.

Na avaliação andrológica observou-se uma diminuição considerável na motilidade, tônus e vigor dos animais 12, 22, 51, 54 e 57 e em especial o animal 00 que obteve todos os resultados zerados. No que concerne a mensuração do diâmetro testicular, observou-se nos dois primeiros grupos (cauda do epidídimo e via conjuntival), um aumento da largura testicular, porém não houve diferença significativa.

Foi amplificado DNA de *A. seminis* a partir de sêmen dos animais 51, 57, 22, 00, 18, 12 e

47 e de fragmentos de testículo dos animais 12 e 57. O produto amplificado da amostra revelou fragmento do tamanho indicado ao descrito para os primers utilizados para *A. seminis*.

DISCUSSÃO

Observou-se no IDGA um número considerável de animais falso-positivo para *B. ovis* na terceira, quarta e, em especial, na quinta coleta, o que corrobora com os achados de Santos et al.¹⁶ que encontrou 8% (n=5) de ovinos falso-positivo para *B. ovis* e 13% (n=9) de caprinos falso-positivo para o mesmo agente.

Clinicamente, a infecção por *A. seminis* caracteriza-se por alterações inflamatórias crônicas que envolvem o epidídimo e o testículo.⁴ Estas alterações foram devidamente comprovadas quando da avaliação clínica dos animais reprodutores da espécie caprina após a infecção experimental, onde os animais 18, 51 e 57 apresentavam quadro clínico de orquite e epididimite unilateral com consistência firme, achados confirmados também por Al-Katib & Denis²⁰ e Moustacas et al.,³ em trabalho de infecção experimental, que confirma a predileção do *A. seminis* pela cauda do epidídimo. O período de 90 dias pode-se não ter sido suficiente para uma evolução crônica capaz de expressar sinais clínicos e achados histopatológicos nos outros animais. Deve-se destacar que as alterações clínicas estão associadas à baixa concentração, baixa motilidade e a não viabilidade espermática, que foram evidenciados nos animais 00, 12, 22, 51, 54 e 57 pelo exame andrológico, além da presença de neutrófilos no sêmen, que comprometem a taxa de fertilidade dos reprodutores, e em regiões sem histórico de diagnóstico da infecção os prejuízos econômicos podem ser ainda maiores devido à dificuldade de identificação dos sintomas.

Os achados relacionados às lesões macroscópicas observadas quando da necropsia dos animais 51 e 57 vem de encontro aos relatos descritos por outros autores, que descreveram lesões caracterizadas por aumento de volume da cauda do epidídimo, de um ou de ambos os testículos, afetando a cabeça e o corpo com espessamento da túnica albugínea ocasionando epididimite, orquite, atrofia e diminuição na consistência testicular, além de abscessos na cauda do epidídimo^{20,3}, no testículo e no saco escrotal, exsudato purulento, pastoso ou granular, branco acinzentado, ou material calcificado pode ser encontrado unilateral ou bilateralmente.^{21,22,3} Ainda pode ser encontrado aumento dos linfonodos inguinais e ilíacos internos. O quadro de lesões deve ser considerado no diagnóstico das epididimites infecciosas agudas, embora a sua etiologia só possa ser definida por meio do exame

bacteriológico ou técnicas moleculares, pois outras bactérias podem causar lesões semelhantes.⁴

Na epididimite subaguda a crônica, as lesões histológicas causadas por *A. seminis* geralmente consistem de edema e fibrose intersticial do epidídimo, oclusão dos ductos epididimários com ausência de espermatozoides, reação inflamatória predominantemente linfoplasmocitária intersticial multifocal no testículo, mineralização de alguns túbulos seminíferos, necrose e inflamação piogranulomatosa no epidídimo e testículo, redução ou ausência de espermatozoides nos túbulos seminíferos, áreas de vacuolização do epitélio com pouca evidência de espermatogênese, além de atrofia tubular com retenção espermática e formação de granulomas.^{7,23,13,24,21} Na infecção aguda, as lesões descritas por West²¹ correspondem a necrose, descamação do epitélio e alterações císticas dos túbulos da parte afetada do epidídimo, infiltração por neutrófilos, e alguns macrófagos e linfócitos, e degeneração e necrose de neutrófilos e espermatozoides. Os achados microscópicos observados nos animais 51 e 57 estão semelhantes com os citados na literatura.

Analisando-se os indicadores de produção, há relatos que revelam deficiências sanitárias em relação à criação de pequenos ruminantes na região semiárida do Nordeste do Brasil,²⁵ demonstrando a necessidade de minimização dos prejuízos provocados pelas perdas reprodutivas. Em particular, destacam-se as características da infecção por *A. seminis*, cujos efeitos não são perceptíveis nem mensuráveis,² especialmente em criações extensivas ou por produtores não alertados para a importância econômica da doença.⁴

O isolamento (três animais) de *A. seminis* em animais experimentalmente inoculados com um isolado oriundo do primeiro isolamento em caprinos no Brasil,¹⁶ e confirmação por diagnóstico andrológico (seis animais), histopatológico (dois animais), sinais clínicos (três animais) e molecular (seis animais), se reveste de importância em função do que representa a atividade da caprinocultura no contexto da cadeia produtiva e seus impactos econômicos para a região semiárida do Nordeste do Brasil, visto que a infecção foi reproduzida novamente na espécie caprina de um isolado oriundo de outro caprino. Diante disso, *A. seminis* deve ser considerado como diagnóstico diferencial em casos de epididimite em pequenos ruminantes, especialmente na região Nordeste do Brasil, onde a criação consorciada de caprinos e ovinos é uma prática amplamente adotada e o agente já foi isolado em ovinos⁴ e em caprinos,¹⁶ podendo ser esse modelo de criação um fator de risco na contaminação cruzada entre ovinos e caprinos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o modelo de infecção experimental utilizando caprinos, comprovou a patogenicidade do isolado de *A. seminis*, demonstrando a predileção do agente pelo epidídimo, com evidência de sinais clínicos, lesões histopatológicas, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.

Agradecimentos. - A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

1. Gouletsou PG & Fthenakis GC. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Vet Microbiol.* 2015;181:130-135.
2. Gomes MJP. Isolamento e identificação de *Chlamydia psittaci* de reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ. 1991 95p.
3. Moustacas VS, Silva TMA, Costa LF, Carvalho Junior CA, Santos RL & Paixão TA. Clinical and Pathological Changes in Rams Experimentally Infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *Sci World J.* 2014;2014:1-10.
4. Bezerra M J G, Santos A S, Cruz J A L O, Kung E S, Sá S G, Jabour F F, Brito M F & Mota R A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. *Pesq Vet Bras.* 2012;32(5):369-373.
5. Dibarrat JA, Aparicio ED, Reynoso BA, Aparicio BD, Gutiérrez VRT & Pérez, JT. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral com *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Téc Pecu Méx.* 2006;44:257-267.

6. Hajtós I, Fodor L, Glávits R & Varga J. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1987;34:138-147.
7. Baynes ID & Simmons GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* N. sp. *Aust. Vet. J*. 1960;36:454-459.
8. Livingston CW & Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am J Vet Res*. 1964;25:660-663.
9. Worthington RW & Bosman PP. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *J South Africa Vet Assoc*. 1968;39:81-85.
10. Gumbrell RC & Smith JMB. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine *Actinobacilli*. *J Gen Microbiol*. 1974;84:399-402.
11. Robles CA, Urcullu JA, Uzal FA & Merio R. Primer diagnóstico em Patagonia de orchideoepididimitis em carneros por bacilos pleomórficos gram negativos. *Vet Argent*. 1990;7:453-455.
12. Heath PJ, Davies IH, Morgan JH & Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in United Kingdom. *Vet Rec*. 1991;129:304-307.
13. Puente-Redondo DA, García del Blanco N, Pérez-Martínez C, González-Rodríguez MC, Rodríguez-Ferri EF & Gutiérrez-Martín CB. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital Tract of Rams in Spain. *J Comp Pathol*. 2000;122:217-222.
14. Schreiner E, Gomes MJP, Cardoso MI, Fernandes JCT, Hope LP, Laitano JLL & Fernandes RE. Epididimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul. XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 1992, Gramado, RS, 1992;p.96. (Resumo).
15. Gregory L, Rizzo HH, Meira Junior EBS, Lins GJV, Lins GPV & Pinheiro ES. Relato do primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*. 2009;33(2):105-107.
16. Santos FA, Azevedo EO, Azevedo SS, Garino Junior F, Mota RA, Kim PCP, Gomes ALV & Alves CJ. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):205-209.
17. Krieg NR & Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. P.660-663. In: Williams & Wilkins, Baltimore.
18. Appuhamy S, Low JC, Parton R & Coote JG. Specific PCR primers from the *Actinobacillus seminis*. *J Appl Microbiol*. 1998b;185:941-948.

19. Appuhamy S, Coote JG & Low JC. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *J Clin Microbiol.* 1998a;36:814-817.
20. Al-Katib WA & Dennis SM. Epididymal and testicular lesions in rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *N Z Vet J.* 2007;55(3):125–129.
21. West DM. Gram-negative pleomorphic infections: *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* and *Haemophilus sommi*. 2004;p1655-1660. In: Coetzer JAW & Tustin RC (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol 3. Oxford University Press Oxford.
22. Foster RA & Lads PW. Male genital system. 2007;p.590-591. In: Jubb KVF, Kennedy PC & Palmer N (Eds). *Pathology of Domestic Animals*, 5th ed. Saunders Elsevier, Toronto.
23. Tonder EMV. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J South African Vet Med Assoc.* 1973;44:235-240.
24. Gomes MJP, Driemeier D, Bonetti AL, Eidt M & Azambuja DR. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis*, no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Fac Vet. UFRGS* 2001;29:55-58.
25. Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF & Haddad JPA. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52(5):534-543.

Legendas das Figuras



Fig. I. Aumento unilateral de consistência firme após 30 dias no epidídimo e testículo do animal 51.

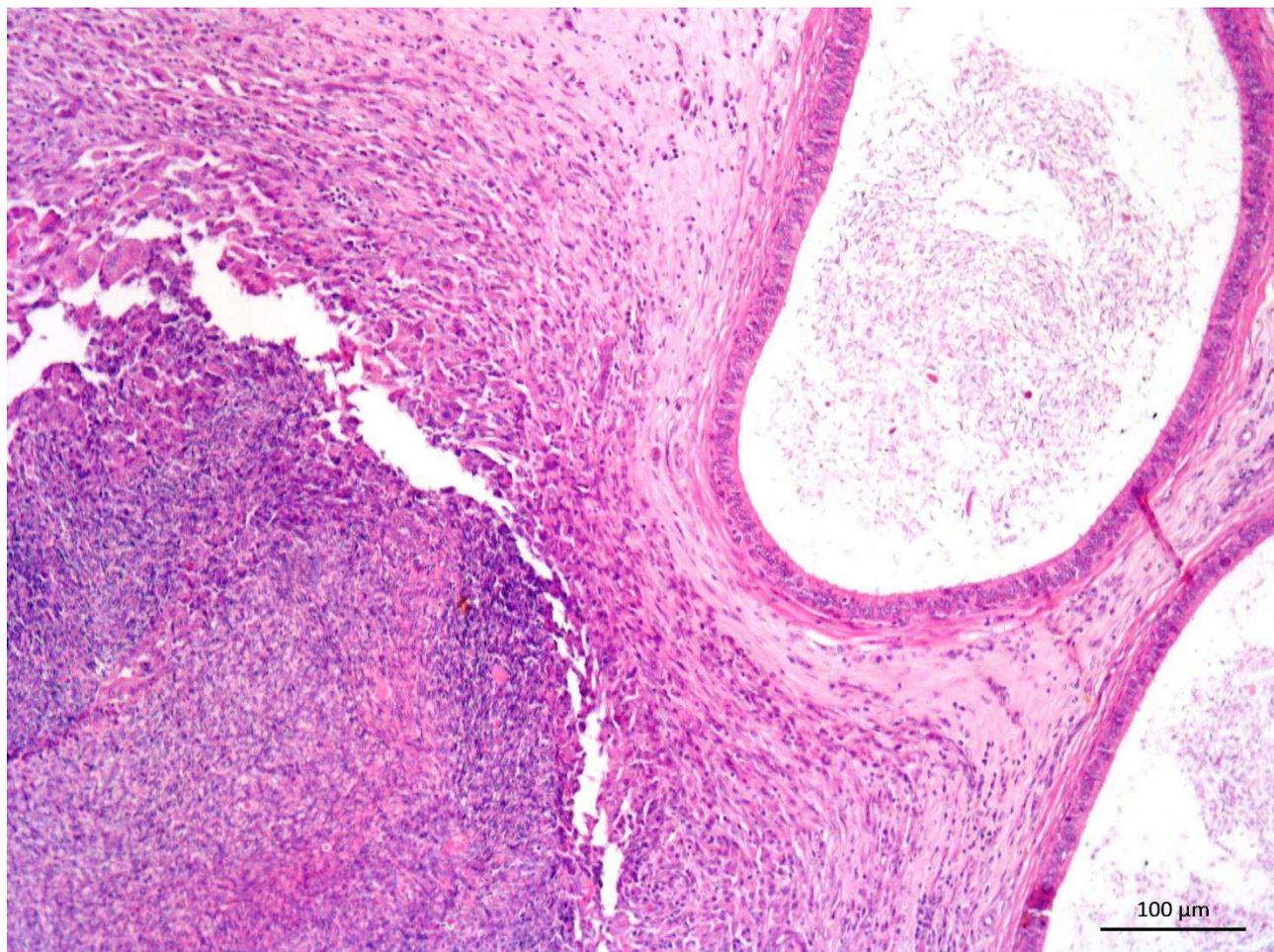


Fig. II. Epidídimo – Epididimite necrosante focal, com infiltrado inflamatório intersticial mononuclear acentuado. H.E, Barra= 100µm.

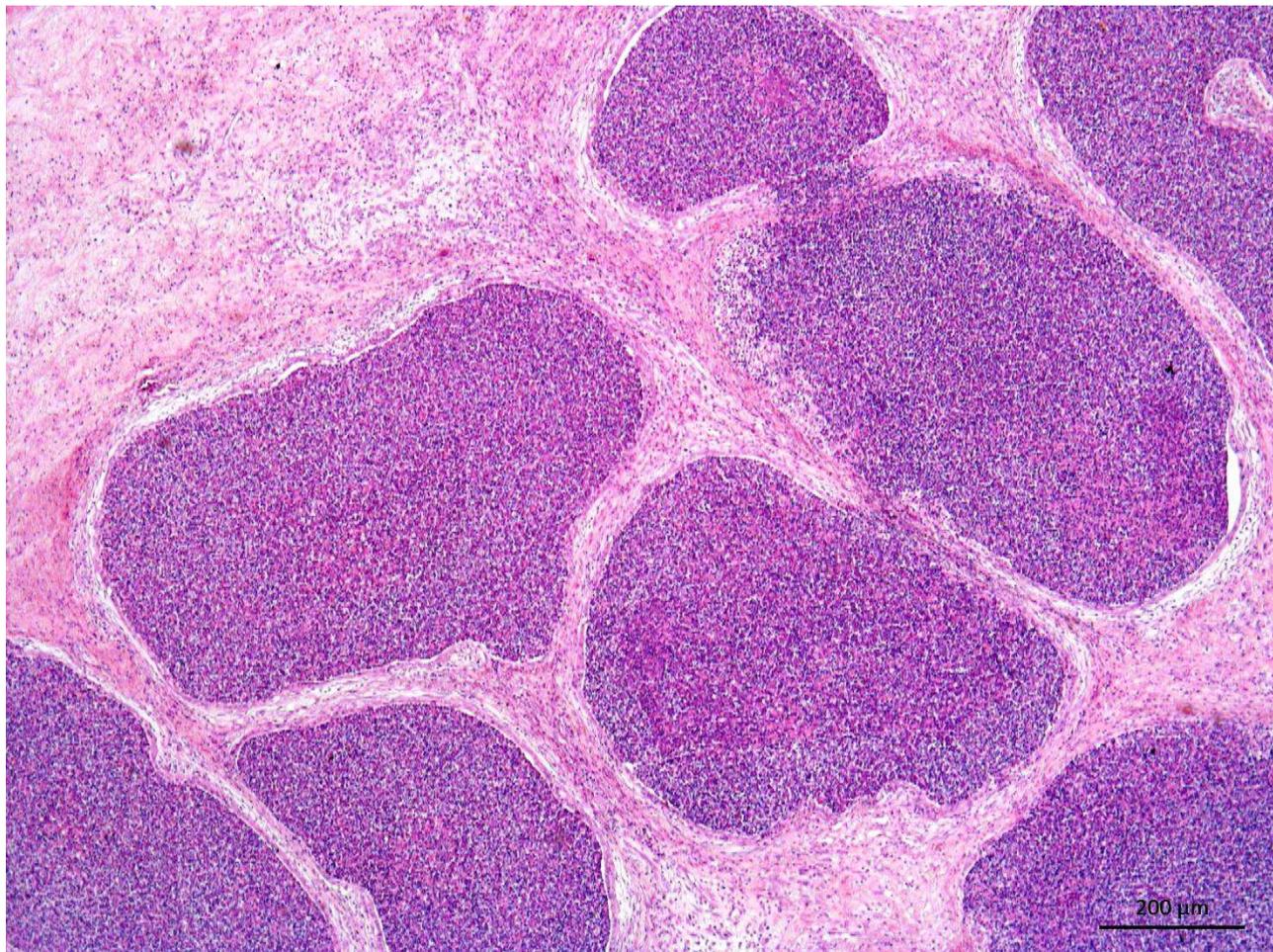


Fig. III. Epidídimo – Severa necrose do epitélio de revestimento dos ductos epididimários, intensa proliferação de tecido conjuntivo fibroso circunscrevendo os ductos, conjuntamente com discreto infiltrado de células mononucleares intersticiais. H.E, Barra= 200μm

Tabela 1. Resultados da inoculação experimental de amostra de *Actinobacillus seminis* (amostra SAAS01) isolada de caprino.

Identificação do Animal	Via de Inoculação	Sinais Clínicos	Achados Histopatológicos	Achados Andrológicos	Cultivo e Isolamento	PCR
18	Cauda do epidídimo	+	-	-	+	+
51	Cauda do epidídimo	+	+	+	+	+
22	Cauda do epidídimo	-	-	+	-	+
17	Controle Negativo	-	-	-	-	-
15	Controle Negativo	-	-	-	-	-
59	Saco conjuntival	-	-	-	-	-
12	Saco conjuntival	-	-	+	-	+
57	Saco conjuntival	+	+	+	+	+
47	Controle Negativo	-	-	-	-	-
50	Controle Negativo	-	-	-	-	-
54	Intra-prepucial	-	-	+	-	-
14	Intra-prepucial	-	-	-	-	-
00	Intra-prepucial	-	-	+	-	+
52	Controle Negativo	-	-	-	-	-
56	Controle Negativo	-	-	-	-	-

5. CAPÍTULO III

SOROPREVALÊNCIA E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS UTILIZADAS NO DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE OVINA NO BRASIL

“Seroprevalence and comparison of sorological techniques used in the diagnosis of
brucellosis ovine in Brazil”

Trabalho submetido à Revista
Semina: Ciências Agrária – PR.
Qualis B1-JCR 0,229. Manuscrito
em português.

SOROPREVALÊNCIA E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS UTILIZADAS NO DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE OVINA NO BRASIL

SEROPREVALENCE AND COMPARISON OF SOROLOGICAL TECHNIQUES USED IN THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS OVINE IN BRAZIL

Fabrine Alexandre dos Santos², Francisco Selmo Fernandes Alves³, Raimundo Rizaldo Pinheiro², Alice Andrioli², Patrícia Yoshida Faccioli Martins², Ana Milena Cesar Lima⁴, Luis Antônio Mathias⁵, Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva⁵, Sérgio Santos de Azevedo⁶, Clebert José Alves^{6*}

Resumo

O objetivo deste trabalho, foi selecionar amostras de ovinos sorologicamente positivos no teste de IDGA, de ambos os sexos, e de vários estados do Nordeste (PI, CE, SE, PB, RN), sendo 130 do banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos provenientes dos animais testados (n= 2465 ovinos) e 41 do banco de soros do Laboratório de Doenças Transmissíveis do CSTR/UFCG (n= 1134 ovinos), totalizando 171 ovinos positivos, e se comparou com os testes de Fixação do Complemento (FC) e ELISA de competição. Para selecionar as 130 amostras de ovinos positivos foi determinada a prevalência de rebanhos ovinos positivos (focos) e de animais soropositivos para *Brucella ovis* na região semiárida do Nordeste do Brasil. Foram colhidas amostras de sangue de 2465 animais procedentes de 218 rebanhos em cinco Estados, distribuídos em 12 mesorregiões diferentes, um rebanho foi considerado positivo quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. Das 218 propriedades utilizadas 94 (43,11%) apresentaram pelo menos um animal soropositivo, e dos 2.465 animais 149 (6,04%) foram soropositivos. As 41 amostras de ovinos positivos, teve como procedência amostras de sangue de 1.134 animais procedentes de 103 rebanhos em 17 municípios da mesorregião do Sertão, Estado da Paraíba. Para o diagnóstico sorológico da

² Discente de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Patos, PB, Brasil. E-mail: fabrinevet@yahoo.com.br

³ Pesquisadores, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos (CNPQ), (EMBRAPA), Sobral, CE, Brasil. Email: selmo.alves@embrapa.br; rizaldo.pinheiro@embrapa.br; patricia.yoshida@embrapa.br; alice.andrioli@embrapa.br

⁴ Profª convidada da Universidade Vale do Acaraú – Ceará. Email: anamilenalima@yahoo.com.br

⁵ Laboratório de Diagnostico de Leptospirose e Brucelose da UNESP/Jaboticabal. lmathias@fcav.unesp.br; glaucenyracecilia@gmail.com

⁶ Profs., Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB, Brasil. E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br; clebertja@uol.com.br *Autor para correspondência: E-mail: clebertja@uol.com.br.

infecção por *Brucella ovis* foi utilizado o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Um rebanho foi considerado positivo quando apresentou pelo menos um animal soropositivo. No teste de FC não se observou sorologia positiva, enquanto no ELISA quatro animais (2,33%) apresentaram-se soropositivos e 20 animais (11,69%) suspeitos. Não houve diferença entre o número de ovinos positivos entre os bancos de soros estudados, sendo dois animais positivos para cada banco. Para o Banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos, os positivos foram um do Estado de Sergipe e outro do Rio Grande do Norte, enquanto do LDT/CSTR/UFCG, os dois ovinos positivos foram do Estado da Paraíba. Um fato que merece destaque diz respeito ao número de ovinos suspeitos encontrados no banco de soros do LDT/CSTR/UFCG, no total 14 animais do Estado da Paraíba, quando comparado aos seis do banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos. Conclui-se, que a infecção por *Brucella ovis*, detectada por sorologia, encontra-se disseminada em propriedades criadoras de ovinos em cinco Estados do Nordeste do Brasil. Diante dos resultados das amostras positivas ao IDGA e posteriormente submetidas ao teste de FC e ELISA-I e considerando as informações expostas se recomenda que seja feita a associação de testes em paralelo (FC ou IDGA e o ELISA-I.) para melhorar a sensibilidade do diagnóstico.

Palavras-Chave: métodos de diagnóstico, Brucelose ovina, levantamentos sorológicos.

Abstract

The objective of this work was to select samples from seropositive sheep in the IDGA test, both sexes, and from several states of the Northeast (PI, CE, SE, PB, RN), of which 130 were from Embrapa Goat and Sheep serum bank (N = 2465 sheep) and 41 from the sera bank of the Laboratory of Communicable Diseases of the CSTR / UFCG (n = 1134 sheep), totaling 171 positive sheep, and compared with the Complement Fixation test (FC) and competition ELISA. In order to select the 130 samples of positive sheep, the prevalence of positive herds (foci) and of seropositive animals for *Brucella ovis* in the semi-arid region of Northeast Brazil was determined. Blood samples were collected from 2465 animals from 218 herds in five states, distributed in 12 different mesoregions, a herd was considered positive when it presented at least one seropositive animal. Of the 218 properties used, 94 (43.11%) had at least one seropositive animal, and of the 2465 animals 149 (6.04%) were seropositive. The 41 positive sheep samples had as their origin blood samples from 1134 animals from 103 herds in 17 municipalities of the sertão mesoregion,

state of Paraíba. For the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection, the agar gel immunodiffusion test (AGID) was used. A herd was considered positive when it presented at least one seropositive animal. In the FC test, no positive serology was observed, while in the ELISA-I four animals (2.33%) were seropositive and 20 animals (11.69%) suspected. There was no difference between the number of positive sheep among the sera banks studied, being two positive animals for each bank. For the Embrapa Goat and Sheep serum, the positive were one from the State of Sergipe and another from Rio Grande do Norte), while from the LDT / CSTR / UFCG, the two positive sheep were from the state of Paraíba. One fact worth mentioning is the number of suspect sheep found in the serum bank of the LDT / CSTR / UFCG, in a total of 14 animals from the state of Paraíba, when compared to the six from the serum bank of Embrapa goats and sheep. It is concluded that *Brucella ovis* infection, detected by serology, is disseminated in sheep-producing properties in five Northeastern Brazilian states. Before the results of the positive samples to the AGID and later submitted to the test of FC and Elisa-i and considering the information exposed we recommend that the association of parallel tests (FC or AGID and the ELISA-i.) be done to increase the sensitivity of the diagnosis.

Keywords: diagnostic methods, ovine brucellosis, herd screening.

Introdução

A produção de pequenos ruminantes é uma atividade largamente explorada nos países tropicais. Neste contexto, o Brasil se destaca com um efetivo estimado em mais de 17,6 milhões de ovinos. Esses rebanhos estão concentrados em maioria na região Nordeste com mais de 10 milhões de ovinos e correspondendo a 57,5% do rebanho nacional (IBGE, 2015). A maior parte dos sistemas de criação é de subsistência, ocorrendo diversos problemas como falta de assistência técnica, deficiências de manejo e baixo nível organizacional dos produtores, que inviabilizam economicamente a atividade devido à baixa produtividade dos rebanhos (COELHO et al., 2011; SOUSA, 2007). O potencial produtivo desta atividade ainda não é satisfatório para o agronegócio nacional, devido à inexistência de fatores que impulsionem o gerenciamento e articulação do setor primário da cadeia produtiva, transformando a atividade mais competitiva e viável economicamente (ARO et al., 2007). Em algumas regiões do país, a ovinocaprinocultura mostra-se mais organizada, viabilizando a produção e caracterizando o sistema produtivo como uma

atividade econômica (SEBRAE, 2009). Apesar da ausência de programas sanitários específicos a pecuária de pequenos ruminantes na região Nordeste tem se desenvolvido, contribuindo para a consolidação da cadeia produtiva nacional (CARVALHO, 2011; MEDEIROS et al., 2005). No entanto, existem deficiências sanitárias envolvidas na ovinocaprinocultura nacional que representam uma importante parcela do déficit produtivo, responsáveis por prejuízos econômicos principalmente causados por doenças infecciosas (FERNANDES, 2009; ALVES et al., 2007).

A Epididimite Ovina é caracterizada por alterações inflamatórias envolvendo o epidídimo dos reprodutores ovinos. A enfermidade está associada a vários agentes microbianos, incluindo vírus, micoplasmas, fungos e bactérias destacando-se a *Brucella ovis* (SANTOS, et al., 2013; ALVES, et al., 2010; CLEMENTINO et al., 2007), e tem sido relatada como uma das principais causas de prejuízos econômicos, pois interfere na fertilidade dos machos infectados, que não são percebidos facilmente em criações extensivas devido a falta de informação dos produtores sobre essa doença (GOMES et al., 1991). Machado et al. (2015) avaliaram a soroprevalência de *B. ovis* em carneiros e os fatores de risco associados ao nível do rebanho no estado do Rio Grande do Sul, fornecendo resultados que foram incorporados ao PROESO (Programa Sanitário Estadual de Adesão Voluntária). O estudo concluiu que os carneiros velhos que permanecem no rebanho podem ser fonte contínua de transmissão de *B. ovis*. No estado da Paraíba, Santos et al. (2013) constataram que a aquisição de animais também foi fator de risco para a brucelose ovina, e que propriedades que realizam tal prática apresentaram 27,6% de positividade contra 12,8% para aquelas que não realizam a compra, com *odds ratio* de 6,06. Isso reforça ainda mais a necessidade de controle do trânsito de animais destinados à reprodução, principalmente nos casos de participação em eventos que envolvam a aglomeração de animais, como exposições, feiras e leilões, bem como a aquisição apenas de animais soronegativos para brucelose (CLEMENTINO et al., 2007).

Diversos estudos utilizando majoritariamente o teste IDGA foram conduzidos no país (ALVES et al., 2016) em que a prevalência variou de 0,0% a 34,0%. De 33 levantamentos sorológicos, somente três (9,1%) não apresentaram animais positivos, e na média verificou-se prevalência total de 7,02% (1365/19437).

A Instrução Normativa Nº 50 de 24 de setembro de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em seu artigo 01 altera a lista das enfermidades passíveis de aplicação de medidas de defesa sanitária animal (BRASIL, 2013). As doenças listadas em seu anexo são de notificação ao serviço veterinário oficial,

dentre estas, a Brucelose Ovina, que é causada pela *Brucella ovis* e faz parte das doenças que requerem notificação mensal de qualquer caso confirmado. A mesma merece atenção por ser frequentemente descrita em trabalhos de pesquisa no Brasil, determinar prejuízos ao setor produtivo da ovinocultura e por fazer parte das enfermidades contempladas inicialmente no Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) do MAPA (BRASIL, 2004).

Tendo em vista que a infecção por *B. ovis* já foi identificada em diversos estados brasileiros e que a doença está contemplada no PNSCO, estruturou-se o presente trabalho que teve como objetivos determinar a prevalência de ovinos soropositivos para *B. ovis* em cinco estados do Nordeste do Brasil e efetuar uma análise comparativa acerca dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico.

Material e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Campina Grande através do protocolo CEP 249/2015.

A região Nordeste do Brasil abrange uma área de mais de 1,5 milhões de km² (18% do território brasileiro), situada abaixo da linha do equador, com predomínio de clima semiárido e bioma típico de Caatinga. Divide-se em quatro sub-regiões (Zona da Mata, Agreste, Sertão e Meio-Norte), composta por nove estados da Federação (Bahia, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Maranhão, Alagoas e Sergipe) (ASA BRASIL, 2013).

Foram utilizados ovinos deslanados adultos e jovens, de ambos os sexos, provenientes de propriedades rurais oriundas de microrregiões com densidade populacional significativa de rebanhos ovinos, em cinco estados do Nordeste: Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Sergipe. A adesão dos proprietários foi voluntária. O número mínimo de propriedades a serem visitadas foi calculado com o uso da fórmula para amostras simples aleatórias (THRUSFIELD, 2007), levando-se em consideração os seguintes parâmetros: prevalência de propriedades com animais soropositivos de 20,39% (SANTOS et al., 2013), erro amostral de 6% e nível de confiança de 95%. Por esses parâmetros seria necessário n amostral de 173 propriedades, no entanto, foram utilizadas 218 propriedades rurais distribuídas da seguinte forma: 24 propriedades na Paraíba, 47 no Rio Grande do Norte, 34 no Ceará, 63 no Piauí e 50 no Estado do Sergipe. A amostragem por propriedade foi estratificada segundo a composição aproximada do rebanho, definida em 60% de matrizes, 35% de jovens (seis a doze meses) e todos os reprodutores adultos. Em cada propriedade foi coletado material de

quinze ovinos, ou então de todos os animais existentes na propriedade caso esse número fosse inferior ou igual a 15.

Para constituir o banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos foram colhidas amostras de sangue de 2.465 ovinos provenientes das 218 propriedades rurais, no período de 2010 a 2012 (ALVES et al., 2013). Após a contenção do animal e assepsia local com solução de álcool iodado, as amostras de sangue foram coletas por punção de veia jugular, utilizando agulhas descartáveis, estéreis, uma para cada animal em tubos a vácuo. Após a realização das coletas, as amostras de sangue foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia da Embrapa Caprinos e Ovinos/CNPC – Sobral/CE. Os tubos com as amostras de sangue foram mantidos à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo com posterior centrifugação. Em seguida, as amostras foram separadas, colocadas em microcubos e previamente identificadas e mantidas a -20°C para serem posteriormente utilizadas nos testes sorológicos. Para constituir o banco de soros do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), foram utilizados 1.134 animais procedentes de 103 propriedades de 17 municípios da mesorregião do Sertão paraibano (SANTOS et al., 2013).

A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi a técnica utilizada como prova diagnóstica de triagem e realizada nos Laboratórios de Doenças Transmissíveis/CSTR/UFCG e de Bacteriologia da Embrapa Caprinos e Ovinos. Foram utilizados *kits* produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), sendo a técnica realizada de acordo com as instruções do fabricante utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*, amostra Reo 198. As amostras positivas no IDGA foram submetidas aos testes de fixação de complemento (FC) e ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA). A FC foi feita no Laboratório de Diagnostico de Leptospirose e Brucelose da UNESP/Jaboticabal, conforme metodologia descrita por Alton et al., (1988), e o ELISA foi realizado no Laboratório de Bacteriologia da Embrapa Caprinos e Ovinos com kits comerciais (IDEXX - Brasil) seguindo o protocolo do fabricante.

Resultados

Dos 2.465 ovinos avaliados, 149 (6,04%; IC 95% = 5,17% – 7,06%) foram soropositivos na IDGA, sendo a menor prevalência de animais observada em Sergipe (3,37%) e a maior no Ceará (7,52 %). Das 218 propriedades investigadas, 94 (43,11%; IC 95% = 36,72% –

49,76%) apresentaram pelo menos um ovino soropositivo. As prevalências por estado variaram de 37,5% na Paraíba à 55,88% no Ceará (Tabela 1).

Foram separadas 130 amostras positivas no IDGA (Banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos), mais 41 amostras provenientes de propriedades rurais da Paraíba (SANTOS et al., 2013) e submetidas aos testes de FC e ELISA, totalizando 171 amostras. Dessas amostras todas foram negativas na FC e, no ELISA, quatro animais (2,33%) foram soropositivos e 20 (11,69%) suspeitos (Tabela 2).

Na tabela 3, estão revelados os resultados para os cinco estados do Nordeste do Brasil, das 130 amostras testadas para o Elisa-i, foram encontrados dois ovinos positivos (Sergipe 1 e Rio Grande do Norte 1) e seis animais suspeitos (Rio Grande do Norte = 1; Sergipe = 2; Piauí = 2; Paraíba = 1)

Discussão

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, 43,11% das propriedades apresentaram pelo menos um animal soropositivo e 6,04% dos animais foram soropositivos para brucelose ovina na IDGA. Essa elevada prevalência demonstra que a brucelose ovina se encontra difundida no Nordeste brasileiro e chama atenção por evidenciar cinco dos nove estados com prevalência de propriedades elevada. Os resultados vêm de encontro a diversos estudos conduzidos no Brasil (ALVES, et al., 2016) e que utilizaram predominantemente a IDGA como teste de diagnóstico, com frequências de positividade que variaram de 0% a 34% para animais, e de 0% a 68,3% para propriedades.

A prevalência encontrada de 6,04% para brucelose ovina em cinco Estados da região Nordeste do Brasil, corroboram aos resultados obtidos em trabalhos conduzidos por Clementino et al. (2007), que encontraram prevalência de 5,67% (28/498) de animais soropositivos em levantamento soroepidemiológico da brucelose por *B. ovis* em reprodutores ovinos deslanados do semiárido da Paraíba e Pinheiro Junior et al. (2009), que investigando 579 amostras oriundas de 16 rebanhos distribuídos em 23 municípios do Estado de Alagoas, utilizando a técnica de IDGA, obtiveram prevalência de 3,1% de animais soropositivos distribuídos em dez propriedades (43,5%), Batista (2012), registrou prevalência no Ceará e Piauí de 7,81% (30/384) e 8,54% (40/468) respectivamente. Santos et al. (2013) detectaram prevalência de 5,20% (59/1134) de animais e 20,39% (21/103) para propriedades na Paraíba e Lima (2015), constatou prevalência de 7,66% (36/470), 5,40% (13/241) e 3,54% (21/593) para os Estados do Rio Grande Norte, Paraíba

e Sergipe. Os valores percentuais observados para as diferentes prevalências, mesmo considerando as diferentes regiões, condições de manejo, fatores espaciais e temporais, bem como pelo tipo de amostragem ficaram relativamente próximas, porém inferior ao observado por Azevedo et al. (2004), que encontraram prevalência de 11,3% para a ocorrência de anticorpos anti-*B. ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do Estado do Rio Grande do Norte e Coletto et al. (2003), que verificaram 16,25% de animais soropositivos no Estado de Pernambuco. Souza et al. (2012) no Estado da Bahia, examinando 694 amostras de soros de ovinos, encontraram prevalência de 0,72% (5/694), bem inferior aos dados encontrados nesta pesquisa. Esses resultados demonstram a disseminação e a importância da enfermidade nos rebanhos ovinos no Nordeste do Brasil e a necessidade de melhor aprofundamento nas práticas sanitárias.

Alves et al. (2016) fazendo uma revisão sobre as publicações nos últimos trinta anos no Brasil, que contemplou 33 levantamentos sorológicos, constataram que destes, três (9,1%) não apresentaram animais positivos, e na média verificou-se uma prevalência total de 7,02% (1365/19437) relacionadas aos principais métodos de diagnóstico utilizado para a sorologia da Brucelose ovina, os resultados observados em relação a prevalência média total no Brasil se assemelham aos encontrados neste trabalho. Analisando retrospectivamente vários trabalhos publicados (ALVES et al., 2016), no intervalo de 30 anos no Brasil, constatou que ainda não existe concordância entre os testes sorológicos, principalmente com a IDGA, fato este que ficou comprovado quando da realização deste trabalho, que ao comparar os resultados de 171 amostras consideradas positivas na IDGA, verificou, que todas as amostras foram negativas na FC e quatro positivas (2,33%) e 20 amostras suspeitas (11,69%) no ELISA. Não houve diferença entre o número de ovinos positivos entre os bancos de soros estudados, sendo dois animais positivos para cada banco. Merece destaque o número de ovinos suspeitos encontrados no banco de soros do LDT/CSTR/UFCG (Tabela 1), no total 14 animais, todos do Estado da Paraíba, quando comparado aos seis do banco de soros da Embrapa Caprinos e Ovinos com um maior número de amostras (2465 ovinos distribuídos entre cinco estados do Nordeste do Brasil), onde só foi encontrado um animal suspeito no Estado da Paraíba. Diante deste quadro, se apresenta possíveis razões para explicar esta situação, primeiro, o número diferente entre as amostras dos dois bancos, para o Estado da Paraíba (Banco de soros CNPC/Sobral = 13/240 e LDT/CSTR/UFCG = 41), segundo, os resultados são compatíveis com o fato do teste de Elisa indireto, apresentar uma capacidade de detecção superior a reação de fixação de complemento (MARINHO & MATHIAS, 1996), terceiro, considerar também a

possibilidade da fixação do complemento não ser capaz de detectar a infecção quando da fase crônica e por último considerar a participação de outros agentes bacterianos, que pode ter influenciado os resultados, levando ao risco de falso positivos, esta hipótese requer mais estudos para o devido esclarecimento da questão com vistas ao diagnóstico diferencial. Nozaki et al. (2004) já tinha observado disparidade quando comparou os testes de IDGA e ELISA, verificou baixa concordância entre as provas sorológicas. Os autores recomendaram a aplicação associada de IDGA e ELISA, de forma a se obter melhor sensibilidade e resultados mais confiáveis. Costa et al. (2016) compararam os resultados de IDGA e ELISA em ovinos no Estado de Minas Gerais e os resultados demonstram evidência sorológica de infecção por *B. ovis* em vários carneiros nas mesorregiões estudadas. O trabalho também conclui que a técnica de ELISA indireto é a mais sensível para o diagnóstico da infecção pela *B. ovis*, quando comparada ao IDGA. Recentemente, a OIE (2009), admitiu em publicação que a combinação em paralelo do teste IDGA e do ELISA-I fornecem os melhores resultados em termos de sensibilidade. Segundo Marin et al. (1989), a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos dependem essencialmente dos antígenos utilizados estudos comparativos demonstraram que o teste de ELISA é mais sensível (97,6%) que o IDGA (96,4%) e FC (92,7%). A combinação de IDGA e ELISA apresentou 100% de sensibilidade contra 96,4% obtidos com a combinação de IDGA e FC. Os três testes apresentaram especificidade de 100%.

Ao comparar o teste de ELISA indireto com o IDGA e FC, Marinho e Mathias (1996), utilizando cepa 63/290 de *Brucella ovis* obtida junto ao laboratório veterinário central do Reino Unido, observaram divergência de resultados. Na análise de 850 amostras de soro de ovinos, o ELISA indireto detectou nove resultados positivos. Destes, nem o IDGA e o FC apresentaram animais reagentes. Os autores associaram este fato à maior capacidade do ELISA indireto em detectar a positividade. Estes resultados vêm de encontro aos dados obtidos no presente estudo.

O teste de IDGA tem como desvantagem o fato de os resultados serem interpretados apenas qualitativamente. Apesar de ambos os testes de FC e IDGA serem apropriados para o diagnóstico da *B. ovis*, alguns carneiros infectados são IDGA negativos, mas FC positivos e vice-versa (FICAPAL et al., 1998). Convém relatar, também, que a bactéria *Dichelobacter nodosus*, agente etiológico da Pododermatite, pode estar relacionada com reação cruzada em testes sorológicos de *B. ovis* (CFSPH, 2010), este agente está presente em diversas regiões brasileiras. Recentemente, alguns trabalhos têm levantado a possibilidade do *Actinobacillus seminis* ser considerado como um diagnóstico diferencial

em casos de epididimite em reprodutores, especialmente na região Nordeste do Brasil, onde a criação consorciada de pequenos ruminantes é uma prática amplamente adotada e o agente já foi isolado em ovinos (BEZERRA et al., 2012). Santos et al. (2014), relataram um fato que chamou atenção no seu trabalho quando do isolamento de *A. seminis*, que foi o resultado positivo da sorologia do caprino em questão na prova de IDGA, utilizando antígeno de *B. ovis*, prova utilizada para o diagnóstico da brucelose ovina, o que levanta a possibilidade de ocorrência de caprinos falsos positivos e porque não admitir também a possibilidade de ovinos falsos positivos para *B. ovis* quando infectados por *A. seminis*.

Documento publicado pela OIE (2009), menciona que a realização de análises sorológicas para as enfermidades em rebanhos deve ser vista no sentido de: avaliar a doença em rebanhos de países e regiões livres; prevenir a disseminação da(s) doença(s) já vinculada(s) nos programas de controle; contribuir para erradicar a infecção no país ou região; confirmar o diagnóstico clínico dos casos; estimar a prevalência no sentido de realizar análise de risco; e identificar animal ou rebanho infectado.

Conclusão

De acordo com o trabalho, a infecção por *Brucella ovis*, detectada por sorologia, encontra-se disseminada em propriedades criadoras de ovinos em cinco Estados do Nordeste do Brasil. Diante dos resultados das amostras positivas ao IDGA e posteriormente submetidas ao teste de FC e ELISA-I e considerando as informações expostas se recomenda que seja feita a associação de testes em paralelo (FC ou IDGA e o ELISA-I.) para aumentar a sensibilidade do diagnóstico e avaliar a possibilidade de outras infecções.

Referências

ALTON G. G.; JONES L. M.; ANGUS R. D.; VERGER J. M. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris. 109p.

ALVES, C. J.; FIGUEIREDO, S. M.; AZEVEDO, S. S.; CLEMENTINO, I. J.; KEID, L. B.; VASCONCELLOS, S. A.; BATISTA, C. S. A.; ROCHA, V. C. M.; HIGINO, S. S.

Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast Region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo. v. 41, n. 2, p. 365-367, 2010.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; *Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte*. 2007. EMBRAPA-CNPC-Documentos, 57p.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; YOSHIDA FACCIOLI, P. Y. F.; VESCHI, J. L. A.; ALVES, C. A.; SANTOS, F. A. *Considerações Epidemiológicas e do Diagnóstico Sorológico da Brucelose Ovina no Brasil*. 2016. Embrapa Ovinos e Caprinos. Sobral – CE, Nota Técnica. 10p.

ALVES, F. S. F. *Estudo zoossanitário da caprinocultura e da ovinocultura tropical: epidemiologia, riscos e impacto econômico das enfermidades*. 2013. Relatório Final: Projeto Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Edital 64/2008. 52f. Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral.

ARO, D. T; POLIZER, K. A; PENA, S. B. O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça – SP. v.3, n.7, p.1-6, 2007.

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 – PB. v. 25, n. 2, p. 45-50, 2004.

ASA BRASIL. *Articulação Semiárido Brasileiro*. 2013. Caracterização do semiárido brasileiro. Disponível em: <<http://www.asabrasil.org.br/portal/Default.asp>>. Acesso em: 10 out. 2016.

BATISTA, H. M. F. *Ocorrência de ovinos soropositivos para Brucella ovis nos rebanhos dos estados do Ceará e do Piauí*. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

BEZERRA, M. J. G; SANTOS, A. S; CRUZ, JALO; KUNG, E. S; SÁ, S. G; JABOUR, F. F; BRITO, M. F; MOTA, R. A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Seropédica. v. 32, n. 5, p. 369-373, 2012.

BRASIL. 2004. 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.

BRASIL. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 50 de 24 de setembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União de 25/09/2013, Seção 1, p.47.

CARVALHO R. B. 2011. *Potencialidades dos Mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos*. Disponível em <<http://www.capritec.com.br/art040521.htm>> Acesso em 15 set. 2015.

COELHO, M. C. S. C.; SOUZA, V. C.; COELHO, M. I. S.; CUNHA, M. P.; MEDINA, F. T. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos em assentamentos no município de Petrolina-PE. *Revista Semiárido de Visu*, v.1, n. 1, p. 32-40, 2011

CFSPH. *The Center for Food Security & Public Health*. 2010. Ovine Epididymitis: *Brucella ovis*. Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1024&context=cfsph_factsheets>. Acessado em 05 de Fev. 2017.

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 semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica. v. 27, n. 4, p. 137-143, 2007.

COLETO, Z. F.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do Estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte. v. 27, n. 3, p. 551-553, 2003.

COSTA, L. F.; PESSOA, M. S.; GUIMARÃES, L. B.; FARIA, A. K. S.; MORÃO, R.P.; MOL, J. P. S.; GARCIA, L. N. N.; ALMEIDA, A. C.; GOUVEIA, A. M. G.; SILVA, M. X.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. *BMC Research Notes*, Londres. v. 9, n. 190, p. 1-5, 016.

FERNANDES, C. E. 2009. *Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela Leptospira spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos*. Dissertação de Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente, Instituto Biológico de São Paulo, SP. 101p.

FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO, J. M.; I, MORIYÓN. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 29, n. 1; p. 13-19, 1998.

GOMES, M. J. P. *Isolamento e identificação de Chlamydia psittaci de reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul*. 1991. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ. 95p.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Pesquisa Pecuária Municipal. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default.shtm>>. Acesso em: 09 de nov. de 2016.

LIMA, A. M. C. *Brucelose ovina: soroprevalência e análise dos fatores de risco nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe*. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

MACHADO, G.; SANTOS, D. V.; KOHEK, I.; STEIN, M. C.; HEIN, H. E.; POETA, A. S.; VIDOR, A. C.; CORBELLINI, L. G. Seroprevalence of *Brucella ovis* in rams and

associated flock level risk factors in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, London, v. 121, n. 1/2, p. 183–187, 2015.

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

MARIN, C. M.; JIMENEZ DE BAGUES, M. P.; BLASCO, J. M.; GAMAZO, C.; MORIYON, I.; DIAZ, R. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Veterinary Research*, London, v. 125, n. 20, p. 504–508, 1989.

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

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. 15, 2004.

OIE (International Organization of Epizootics). *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2009. Ovine Epididymitis (*Brucella Ovis*), v. 2, chapter 2.7.9. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09_OVINE_EPID.pdf. Acesso em 09 de dezembro de 2016.

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*, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 500-508, 2009.

SANTOS, F. A.; HIGINO, S. S.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; FARIAS, A. E. M.; ALVES, F. A. L.; ALVES, C. J. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em ovinos deslanados do semiárido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v. 33, n. 4, p. 459-463, 2013.

SANTOS, F. A.; AZEVEDO, E. O.; AZEVEDO, S. S.; GARINO JUNIOR, F.; MOTA, R. A.; KIM, P. C. P.; GOMES, A. L. V.; ALVES, C. J. Isolation of actinobacillus seminis from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. São Paulo, v. 45, n. 1, p. 205-209, 2014.

SEBRAE/DF. 2009. *Manejo básico de ovinos e caprinos*. Brasília: SEBRAE - DF. 146p.

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

SOUSA, W. H. O Agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*, 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 624p.

Tabela 1. Prevalência de propriedades positivas (focos) e animais para a infecção por *Brucella ovis* em cinco Estados (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe), da região do Nordeste do Brasil. entre os anos de 2010 a 2012

Estados	Animais			Propriedades		
	Nº total	Positivos (%)		Nº total	Positivos (%)	
Paraíba	240	13 (5,4% IC 3,19 – 9,05)		24	9 (37,50% IC 21,16 – 57,29)	
Rio Grande do Norte	470	35 (7,4% IC 5,40 – 10,18)		47	23 (48,94% IC 35,28 – 62,76)	
Ceará	412	31 (7,5% IC 5,35 - 10,48)		34	19 (55,88% IC 39,45 – 71,12)	
Piauí	750	50 (6,6% IC 5,09-8,68)		63	27 (42,86% IC 31,40 – 55,14)	
Sergipe	593	20 (3,3% IC 2,19 – 5,15)		50	16 (38 % IC 25,86 – 51,85)	
Total	2465	149 (6,04% IC 5,17% - 7,06%)		218	94 (43,11% IC 36,72 – 49,76)	

Tabela 2- Resultados da Sorologia para Brucelose ovina por diferentes técnicas diagnosticas.

Amostras	IDGA	FC	ELISA		
			P	S	N
Banco Soros CNPC/ Sobral	130/130	0/130	2	6	122
Banco Soros LDT	41/41	0/41	2	14	25
Total	171/171	0/171	4	20	147

Tabela 3- Resultados da Sorologia para Brucelose ovina em diferentes Estados da região do Nordeste em função das técnicas diagnosticas.

Amostras	IDGA	FC	ELISA		
			P	S	N
Paraíba	13/13	0/13	0/13	1/13	12/13
Rio Grande do Norte	35/35	0/35	1/35	1/35	33/35
Sergipe	20/20	0/20	1/20	2/20	17/20
Piauí	33/33	0/33	0/33	2/33	31/33
Ceará	29/29	0/29	0/29	0/29	29/29
Total	130/130	0/130	2/130	6/130	122/130

6. CONCLUSÕES

Resumidamente, os três artigos que compõem a presente tese levaram às seguintes conclusões:

- O modelo de infecção experimental utilizando caprinos e ovinos comprovou a patogenicidade da amostra de *A. seminis*, isolada de um caprino no semiárido brasileiro e reproduzida em um ovino, comprovando a predileção do agente pelo epidídimo, com quadro clínico, achados histopatológicos, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.
- O modelo de infecção experimental utilizando caprinos, comprovou a patogenicidade do isolado de *A. seminis*, demonstrando a predileção do agente pelo epidídimo, com evidenciação de sinais clínicos, lesões histopatológicas, isolamento bacteriano e diagnóstico molecular positivo.
- Observou-se que a infecção por *Brucella ovis*, detectada por sorologia, encontra-se disseminada em propriedades criadoras de ovinos em cinco Estados do Nordeste do Brasil. Diante dos resultados das amostras positivas ao IDGA e posteriormente submetidas ao teste de FC e ELISA-I e considerando as informações expostas se recomenda que seja feita a associação de testes em paralelo (FC ou IDGA e o ELISA-I) para aumentar a sensibilidade do diagnóstico.
- Sugere-se um aprofundamento dos estudos da epididimite no que concerne aos dois agentes estudados com vista para o diagnóstico diferencial reforçando-se ainda a intensificação das medidas de controle das doenças através de monitoramento constante pelas autoridades competentes.

ANEXOS

Anexo 1: Instruções aos autores para publicações na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.



Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa

numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há

traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Anexo 2: Comprovante de submissão do Capítulo I.

De: "Pesquisa Veterinária Brasileira "

<onbehalf+luiz.vieira+embrapa.br@manuscriptcentral.com>

Enviada: 2016/12/17 22:29:30

Para: clebertja@uol.com.br

Assunto: Pesquisa Veterinária Brasileira - Decision on Manuscript ID PVB-4719.R3

17-Dec-2016

Dear Prof. Alves:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Microbiological, molecular and histopathological findings in small ruminants experimentally infected with Actinobacillus seminis" in its current form for publication in the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Now that your manuscript has been accepted for publication, please proceed for payment in:

if you are are paying from inside Brazil:

http://pvb.sct.embrapa.br/?submission_id=PVB-4719.R3&

14-Apr-2016

or

if you are paying from outside Brazil:

http://pvb.sct.embrapa.br/?tp=1&submission_id=PVB-4719.R3&

14-Apr-2016

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Pesquisa Veterinária Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Luiz Vieira

Associate Editor, Pesquisa Veterinária Brasileira

luiz.vieira@embrapa.br

Anexo 3: Instruções aos autores para publicações na revista Brazilian Journal of Microbiology.



Escopo da revista

A partir do dia 01/01/2015 o Brazilian Journal of Microbiology (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção "Genome Announcement" no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos contidos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;

- As sequências de nucleotídeos que se refere o “announcement” , deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scaffolded) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.
- O manuscrito enviado para a seção “Genome Announcement” deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;

- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo "American Journal Experts".

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

SEÇÕES

Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.

- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

Microbiologia de Alimentos:

Tecnologia de Alimentos

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

Microbiologia Médica:

Patogênese Bacteriana

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

Microbiologia Clínica:**Bacteriologia**

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Micologia

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Virulogia

- Estudos sobre vírus de importância médica.

Microbiologia Ambiental:**Ecologia Microbiana**

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Biotecnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse,

crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência

deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: jroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk

- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. **Artigos de Periódicos**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

b. **Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.*

c. **Livros**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. **Patentes**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. **Teses e Dissertações**

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. **Publicações na Web**

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. **Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor,

abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo:

" _____ "

Nome(s) do(s) Autor(es) _____ Assinatura(s)

Data: ____/____/____

Anexo 4: Versão em Inglês submetido a Revista Brazilian Journal of Microbiology referente ao Capítulo II.

Microbiological, molecular, and histopathological findings in goats experimentally infected with *Actinobacillus seminis*

Fabrine A. Santos^a, Diego Figueiredo da Costa^a, Aline Ferreira da Silva^a, Rosa Maria dos Santos Pessoa^c,
Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha^b, Robério Gomes Olinda^d Antônio F.M. Dantas^d, Marcia Almeida de Melo^d,
Carlos E. Peña Alfaro^d, Sergio S. Azevedo^d, Clebert J. Alves^{d*}

^aAlunos do Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brazil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), Faculdade de Medicina Veterinária, Sousa, PB, Brazil

^cAluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Patos, PB, Brazil

^dDocentes Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brazil

ABSTRACT - The objective of this study was to experimentally evaluate the pathogenicity of an isolate named SAAS01 in 15 goats. The animals were clinically analyzed over a 12-week period, during which time semen collections were performed by electroejaculation, and the scrotal diameter was measured every 20 days. At the end of the experimental period, the animals were euthanized. Samples were subjected to histopathological, microbiological, and molecular diagnoses. These animals were challenged with 2 mL of a suspension containing 1.2×10^9 CFU/mL of *A. seminis* (SAAS01 isolate)¹⁶ by the following routes: intrapreputial, cauda epididymis, and conjunctival. In the clinical evaluation, a unilateral increase in firm consistency can be observed in the epididymides and testes of animals 18, 51, and 57 after 30 days; this firmness continued until

the day of euthanasia. Animals 51 and 57 presented histopathological findings with macroscopically and microscopically significant changes. The isolation of small (1 to 2 mm), smooth, shiny, and pigment-free colonies was possible from the semen material collected from animals 18, 51, and 57 in the third and fourth collections. DNA of *A. seminis* was amplified from the semen of animals 51, 57, 22, 00, 18, and 12, and from testicular fragments from animals 12 and 57. The experimental infection model using goats confirmed the pathogenicity of the isolate of *A. seminis*, demonstrating the predilection of *A. seminis* for the epididymis, with evidence of clinical signs, histopathological lesions, bacterial isolation, and a positive molecular diagnosis.

INDEX TERMS: Epididymitis, *Actinobacillus seminis*, experimental inoculation.

INTRODUCTION

Microbial diseases of the male reproductive system in small ruminants have a low incidence risk. However, their impact can be tremendous, especially if they are not quickly diagnosed.¹

Epididymitis has been reported as one of the leading causes of economic losses worldwide in sheep herds because it affects the fertility of infected males, and such losses are not easily perceived in extensive farming systems because farmers lack information about this disease.^{2, 3} One of the main causative agents is *Actinobacillus seminis*, a gram-negative bacterium of the family *Pasteurellaceae* that causes infection when young males reach sexual maturity; it can also be diagnosed in adult animals. Clinically, *A. seminis* infection is characterized by chronic inflammatory changes involving the epididymis and testis.⁴ The pathogenesis is uncertain, but *A. seminis* is likely an opportunistic microorganism present in the preputial cavity that is capable of colonizing deep within the reproductive tract.⁵ One of the possible predisposing factors may be associated with stress induced by hormonal changes during sexual maturation or by nutritional deficiencies, leading to the development of orchitis and epididymitis, especially in young rams.⁶ The first isolation of *A. seminis* was reported by Baynes and Simmons et al.⁷ in Australia, from the semen of rams with epididymitis. Since then, the bacterium has been isolated from sheep on several occasions in several countries: the United States of America,⁸ South Africa,⁹ New Zealand,¹⁰ Hungary,⁶ Argentina,¹¹ the United Kingdom,¹² and Spain.¹³ In Brazil, only five reports exist of isolation of *A. seminis* in sheep,^{14,2,15,4} and one in goats.¹⁶ As the first isolation of *A. seminis* in goats in Brazil had been obtained previously by Santos et al.¹⁶, the objective of the present study was to evaluate the pathogenicity of the isolate (SAAS01) in 15 goats.

MATERIALS AND METHODS

The project was approved by the Research Ethics Committee (CEP, for its Portuguese abbreviation) of the Federal University of Campina Grande through protocol CEP 249/2015.

Fifteen clinically healthy male animals of reproductive age were selected. The animals had been previously tested for *Brucella ovis* by the agar gel immunodiffusion (AGID) test with commercial kits produced by the Paraná Institute of Technology (TECPAR, Curitiba, Brazil). The technique was performed according to the manufacturer's instructions, using lipopolysaccharide and proteins *B. ovis* Reo 198 for all animals that tested negative for anti-*B. ovis* antibodies.

The experiment was carried out at the Lameirão Farm, which belongs to the Federal University of Campina Grande and is located in Santa Terezinha, Paraíba state (PB), Brazil. The animals were initially dewormed and left in paddocks for an adaptation period of 15 days; they were fed native pasture as forage and corn and wheat bran as concentrate. After the adaptation period, the animals were divided into three groups containing five animals each. In the first group, three animals were challenged with 2 mL of a suspension containing 1.2×10^9 CFU/mL of *A. seminis* (SAAS01 isolate)¹⁶ administered via the intrapreputial route, and two were challenged via the same route with sterile saline solution (control). In the second group, three animals were challenged with 2 mL of suspension containing 1.2×10^9 CFU/mL of *A. seminis* (SAAS01 isolate) in the left cauda epididymis, and two were challenged via the same route with sterile saline (control). In the third group, three animals were challenged with 50 μ L of suspension containing 1.2×10^9 CFU of *A. seminis* (SAAS01 isolate) in the left conjunctival sac, and two were challenged via the same route with sterile saline solution (control). Before inoculation, semen and blood serum were collected from all animals to demonstrate the absence of preinoculation infection; these animals were also clinically healthy, without palpable lesions in the testes or epididymides. The animals were clinically analyzed for 12 weeks; semen was collected by electroejaculation, and the scrotal diameter was measured every 20 days, totaling five collections, starting on day zero. The scrotal perimeter analyses were performed using the mean testicular width variation between the first and last collection in the three experimental groups, using the statistical package InStat 3 with the Student-Newman-Keuls multiple comparison test at 5% significance. At the end of the experimental period, the animals were euthanized; the anesthetic protocol included xylazine sedation (Copazine, Schering-Plough Coopers, Brazil) at a dose of 0.5 mg/kg live weight and general anesthesia with 2.5% sodium thiopental (Cristália Produtos

Químicos Farmacêuticos LTDA) at a dose of 10 mg/kg of live weight, followed by electrocution. Subsequently, necropsy was performed to collect fragments of the corpus and cauda epididymis, vas deferens, testis, and seminal glands. These samples underwent histopathological, microbiological, and molecular diagnoses. At the time of semen collection, an electroejaculator specific for small ruminants was used with standardized waves and amplitudes and with lubricating gel, under the guidance of animal reproduction specialists.

Tissue and semen samples were cultured on blood agar and *Brucella* agar supplemented with defibrinated sheep blood at a concentration of 5% of the total volume. All samples were incubated in 10% CO₂ aerobic atmosphere for five days. The isolated bacteria underwent biochemical tests for catalase, oxidase, nitrate, esculin, motility, maltose, xylose, galactose, lactose, mannose, and trehalose, according to Krieg & Holt.¹⁷ For the histopathological diagnosis, the samples were fixed in 10% formalin, dehydrated, diaphonized, and embedded in paraffin. The blocks were cut with a microtome into 5- μ m sections that were stained by the Hematoxylin-Eosin (HE) technique.

For molecular diagnosis by polymerase chain reaction (PCR), the semen, blood serum, organ fragments, and culture samples were subjected to DNA extraction using the Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit (Qiagen®, Austin, USA), according to the manufacturer's protocol. The primers SRJAS1 (CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC) and SRJAS2 (AAGAAAAGACGAAGAGACATT) were used according to Appuhamy et al.,¹⁸ and they amplified a 436-bp fragment of the 16S region of the rRNA. The amplification reactions were carried out in a final volume of 12.5 μ L containing 2.5 μ L of genomic DNA; 0.5 μ L of each primer at 30 μ M; 2.5 μ L of ultrapure water (Milli-Q®, Darmstadt, Germany); and 6.25 μ L of Top Taq Master Mix (Qiagen®, Austin, USA), according to the supplier's protocol. The amplification was performed in an XP Thermal Cycler (Bioer Technology CO LTD, Qingdao, China), and the thermal profile of the reaction stages consisted of initial DNA denaturation at 94 °C (1 min), followed by 35 cycles at 94 °C for 30 sec for denaturation, 55 °C for 30 sec for annealing, and 72 °C for 6 min for extension, with a final extension of 1 min at 72°C, according to Appuhamy et al.¹⁹ The amplified products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis. The DNA bands were visualized under UV light.

RESULTS

No reaction was observed for *B. ovis* infections by the AGID test at the first (pre-inoculation) and second collection. However, reactive animals were observed in the third collection (12 and 22), fourth collection (18

and 14), and fifth collection (51, 18, 57, 12, and 00).

The results are shown in Table 1 according to the animal identification and inoculation route. A clinical evaluation revealed a unilateral increase of firm consistency after 30 days in the epididymis and testis of animals 18, 51 (Fig. I), and 57 that continued until the day of euthanasia. Animals 51 and 57 presented histopathological findings with macroscopically and microscopically significant changes.

Small (1 to 2 mm), smooth, shiny, and pigment-free colonies were isolated from the semen from animals 18, 51, and 57 collected in the third and fourth collection. By Gram staining, bacteria with gram-negative rod morphology were identified. The isolate was catalase-, oxidase-, nitrate- and esculin-positive and motility-negative; produced acid in maltose and xylose; and did not produce acid in galactose, lactose, mannose, or trehalose. The morphology and staining and biochemical characteristics allowed identification of the bacteria as *A. seminis*. No bacterial growth suggestive of *A. seminis* was found in the materials of the other animals.

In two animals (51 and 57), an increase in size was observed in the left epididymis, with yellowish foci filled with yellowish viscous contents (purulent exudate) surrounded by a fibrous tissue capsule. Histopathological examination of the epididymis revealed central necrosis foci circumscribed by marked pyogranulomatous inflammation (Fig. II), predominantly composed of neutrophils, macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells in two animals (51 and 57). In addition to lymphocytes and plasma cells in the center, abundant connective tissue surrounded the granulomatous reaction. Epithelial necrosis in the epididymal ducts (Fig. III), occasional multinucleated giant cells, phagocytizing eosinophilic material, and degenerating intraluminal spermatozoa were present. In the testis, foci of degeneration of the seminiferous epithelium and occasional multifocal and discrete areas of necrosis associated with inflammatory infiltration of polymorphonuclear cells were present. In the interstitial fluid, discrete, multifocal, mixed, inflammatory infiltrate was observed.

In the andrological evaluation, a considerable decrease was observed in the motility, tonus, and vigor for animals 12, 22, 51, 54, and 57, and especially animal 00, whose results were all zero. Regarding testicular diameter measurement, an increase was observed in the testicular width in the first two groups (cauda epididymis and conjunctival route), but no significant difference was observed.

A. seminis DNA was amplified from semen collected from animals 51, 57, 22, 00, 18, 12, and 47 and from testis fragments from animals 12 and 57. The amplified product of the sample revealed a fragment of the same size indicated for the primers used for *A. seminis*.

DISCUSSION

The results for the AGID showed a considerable number of false-positive animals for *B. ovis* in the third, fourth, and especially the fifth collection, which corroborates the findings of Santos et al.,¹⁶ who found 8% (n = 5) of sheep and 13% (n = 9) of goats to have false-positive results for *B. ovis*.

Clinically, *A. seminis* infection is characterized by chronic inflammatory changes involving the epididymis and testis.⁴ These changes were duly confirmed by the clinical evaluation of the bucks, with animals 18, 51, and 57 presenting orchitis and unilateral epididymitis with firm consistency. Similar findings were also reported by Al-Katib & Denis²⁰ and Moustacas et al.³ in a study using experimental infection, confirming the predilection of *A. seminis* for the cauda epididymis. Ninety days may not have been sufficient to elicit clinical signs and histopathological findings of an evolving chronic condition in the other animals. The clinical changes are associated with low sperm concentration, motility, and viability, which were evident in animals 00, 12, 22, 51, 54, and 57 in the andrological examination. In addition, neutrophils were present in the semen, which compromise the fertility rate of bucks. Furthermore, in regions with no history of infection, economic losses may be even greater because of the difficulty in identifying the symptoms.

The findings related to macroscopic lesions observed at the necropsy of animals 51 and 57 are in disagreement with the reports of other authors, who described lesions characterized by an enlargement of the cauda epididymis of one or both testicles but also found that the caput and corpus may also be affected, with thickening of the tunica albuginea, epididymitis, orchitis, atrophy, and decreased testicular consistency; in addition, abscesses in the cauda epididymis^{20,3}, testis, and scrotal sac, with a grayish white, purulent, pasty, or granular exudate, or calcified material, can be found unilaterally or bilaterally.^{21,22,3} An increase in the inguinal and internal iliac lymph nodes can also be found. The lesions should be considered in the diagnosis of acute infectious epididymitis, although its etiology can only be defined through bacteriological examination or molecular techniques, since other bacteria can cause similar lesions.⁴

In subacute to chronic epididymitis, the histological lesions caused by *A. seminis* usually consist of edema and interstitial fibrosis of the epididymis, occlusion of the epididymal ducts with absence of spermatozoa; predominantly multifocal, interstitial, lymphoplasmacytic inflammatory reaction in the testis; mineralization of some seminiferous tubules; necrosis and pyogranulomatous inflammation in the epididymis and testis; reduction or absence of spermatozoa in the seminiferous tubules; areas of vacuolation of the epithelium, with

little evidence of spermatogenesis, as well as tubular atrophy with sperm retention; and the formation of granulomas.^{7,23,13,24,21} In acute infection, the lesions described by West²¹ correspond to necrosis, epithelial scaling, and cystic changes of the tubules of the affected part of the epididymis, infiltration by neutrophils and by some macrophages and lymphocytes, and degeneration and necrosis of neutrophils and spermatozoa. The microscopic findings observed in animals 51 and 57 are similar to those reported in the literature.

An analysis of animal production indicators yielded reports of health deficiencies in relation to the small ruminant production in the semiarid region of northeastern Brazil,²⁵ demonstrating the need to minimize the losses caused by reproductive losses. In particular, the characteristics of *A. seminis* infection are noteworthy, the effects of which are neither perceptible nor measurable,² especially in extensive farming systems or by farmers who are not aware of the economic importance of the disease.⁴

The isolation (three animals) of *A. seminis* in animals experimentally inoculated with an isolate obtained from the first isolation in goats in Brazil,¹⁶ and confirmation by andrological (six animals), histopathological (two animals), clinical (three animals), and molecular (six animals) diagnoses, are important because of what goat production represents to the production chain and economic impact to the semiarid region of northeastern Brazil, given that the infection was reproduced in goats using an isolate obtained from another goat. Thus, *A. seminis* should be considered as a differential diagnosis in cases of epididymitis in small ruminants, especially in the Northeast region of Brazil, where farmers often raise both goats and sheep together and where the agent has been isolated in both sheep⁴ and goats,¹⁶ which may indicate a risk factor for cross-contamination between sheep and goats.

CONCLUSION

The experimental infection model using goats confirmed the pathogenicity of the *A. seminis* isolate, demonstrating the predilection of *A. seminis* for the epididymis, with evidence of clinical signs, histopathological lesions, bacterial isolation, and a positive molecular diagnosis.

Acknowledgements. – Thanks to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, for its abbreviation in Portuguese) for granting a Graduate scholarship.

REFERENCES

1. Gouletsou PG & Fthenakis GC. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Vet Microbiol.* 2015;181:130-135.
2. Gomes MJP. Isolamento e identificação de *Chlamydia psittacide* reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ. 1991 95p.
3. Moustacas VS, Silva TMA, Costa LF, Carvalho Junior CA, Santos RL & Paixão TA. Clinical and Pathological Changes in Rams Experimentally Infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *Sci World J.* 2014;2014:1-10.
4. Bezerra M J G, Santos A S, Cruz J A L O, Kung E S, Sá S G, Jabour F F, Brito M F & Mota R A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. *Pesq Vet Bras.* 2012;32(5):369-373.
5. Dibarrat JA, Aparicio ED, Reynoso BA, Aparicio BD, Gutiérrez VRT & Pérez, JT. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral com *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Téc Pecu Méx.* 2006;44:257-267.
6. Hajtós I, Fodor L, Glávits R & Varga J. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. [Zentralbl Veterinarmed B.](#) 1987;34:138-147.
7. Baynes ID & Simmons GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* N. sp. *Aust. Vet. J.* 1960;36:454-459.
8. Livingston CW & Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am J Vet Res.* 1964;25:660-663.
9. Worthington RW & Bosman PP. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *J South Africa Vet Assoc.* 1968;39:81-85.
10. Gumbrell RC & Smith JMB. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine *Actinobacilli*. *J Gen Microbiol.* 1974;84:399-402.

11. Robles CA, Urcullu JA, Uzal FA & Merio R. Primer diagnostico em Patagonia de orchideoepididimitis em carneros por bacilos pleomorficos gram negativos. *Vet Argent.* 1990;7:453-455.
12. Heath PJ, Davies IH, Morgan JH & Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in United Kingdom. *Vet Rec.* 1991;129:304-307.
13. Puente-Redondo DA, García del Blanco N, Pérez-Martínez C, González-Rodríguez MC, Rodríguez-Ferri EF & Gutiérrez-Martín CB. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital Tract of Rams in Spain. *J Comp Pathol.* 2000;122:217-222.
14. Schreiner E, Gomes MJP, Cardoso MI, Fernandes JCT, Hope LP, Laitano JLL & Fernandes RE. Epididimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação Artificial no Rio Grande do Sul. XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 1992, Gramado, RS, 1992; p.96. (Resumo).
15. Gregory L, Rizzo HH, Meira Junior EBS, Lins GJV, Lins GPV & Pinheiro ES. Relato do primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33(2):105-107.
16. Santos FA, Azevedo EO, Azevedo SS, Garino Junior F, Mota RA, Kim PCP, Gomes ALV & Alves CJ. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):205-209.
17. Krieg NR & Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. P.660-663. In: Williams & Wilkins, Baltimore.
18. Appuhamy S, Low JC, Parton R & Coote JG. Specific PCR primers from the *Actinobacillus seminis*. *J Appl Microbiol.* 1998b;185:941-948.
19. Appuhamy S, Coote JG & Low JC. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *J Clin Microbiol.* 1998a;36:814-817.
20. Al-Katib WA & Dennis SM. Epididymal and testicular lesions in rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *N Z Vet J.* 2007;55(3):125-129.
21. West DM. Gram-negative pleomorphic infections: *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* and *Haemophilus sommi*. 2004; p.1655-1660. In: Coetzer JAW & Tustin RC (Eds), Infectious Diseases of Livestock. Vol 3. Oxford University Press Oxford.
22. Foster RA & Lads PW. Male genital system. 2007; p.590-591. In: Jubb KVF, Kennedy PC & Palmer N (Eds). Pathology of Domestic Animals, 5th ed. Saunders Elsevier, Toronto.

23. Tonder EMV. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J South African Vet Med Assoc.* 1973;44:235-240.
24. Gomes MJP, Driemeier D, Bonetti AL, Eidt M & Azambuja DR. Epididimite ovina: isolamento de *Actinobacillus seminis*, no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Fac Vet. UFRGS* 2001;29:55-58.
25. Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF & Haddad JPA. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52(5):534-543.

Figure legends



Fig. 1. Unilateral increase in firm consistency in the epididymis and testis of animal 51 after 30 days.

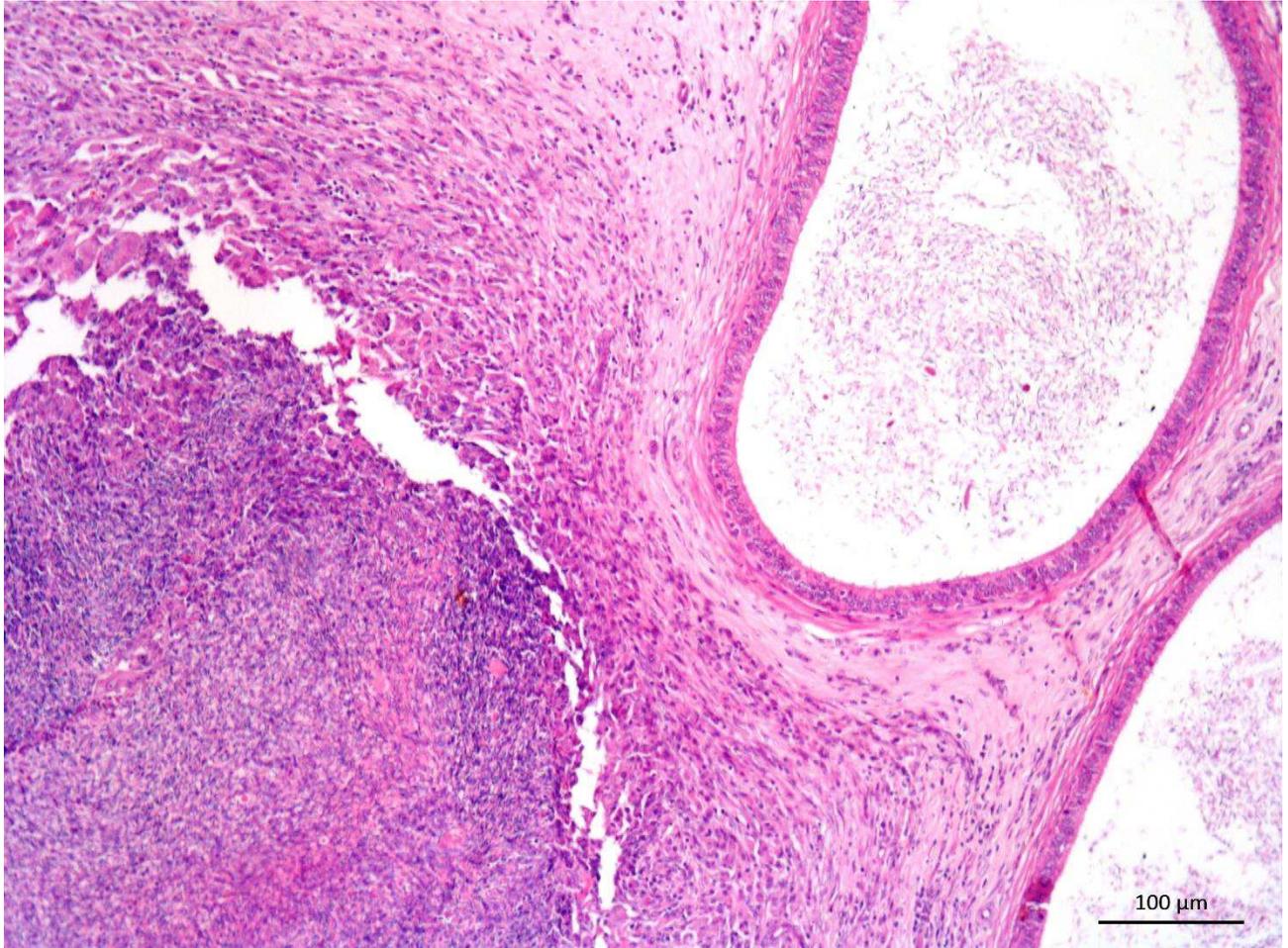


Fig. II. Epididymis - Necrotizing focal epididymitis, with marked mononuclear interstitial inflammatory infiltrate.

HE, Bar = 100 μ m.

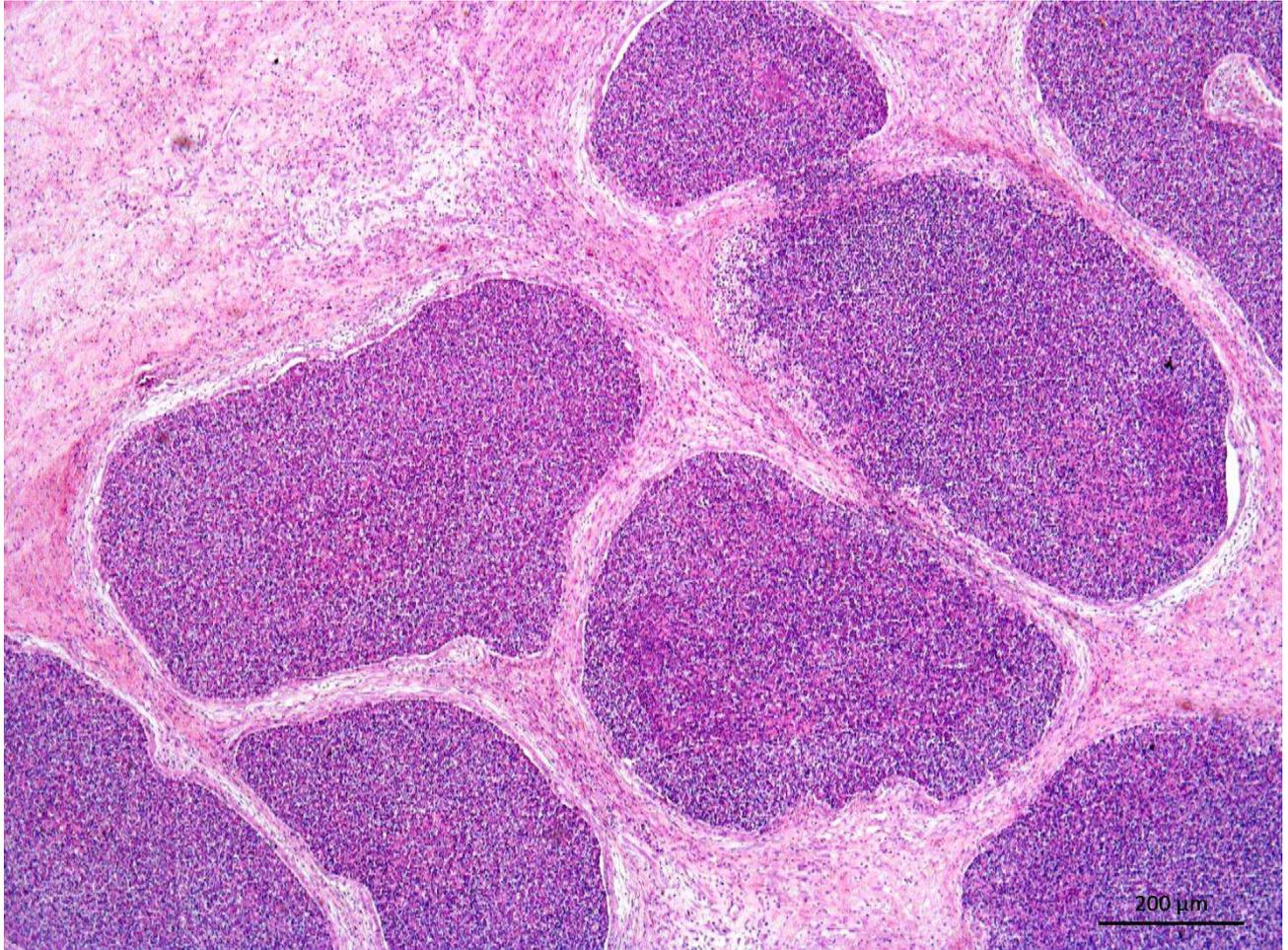


Fig. III. Epididymis - Severe epithelial necrosis of the epithelium of the epididymal ducts, intense proliferation of fibrous connective tissue circumscribing the ducts, together with discrete interstitial mononuclear cell infiltration. HE, Bar = 200 μ m

Table 1. Results of experimental inoculation of a sample of *Actinobacillus seminis* (sample SAAS01) isolated from goats.

Animal Identification	Route of Inoculation	Clinical Signs	Histopathological Findings	Andrological Findings	Culture and Insulation	PCR
18	Cauda epididymis	+	-	-	+	+
51	Cauda epididymis	+	+	+	+	+
22	Cauda epididymis	-	-	+	-	+
17	Negative Control	-	-	-	-	-
15	Negative Control	-	-	-	-	-
59	Conjunctival sac	-	-	-	-	-
12	Conjunctival sac	-	-	+	-	+
57	Conjunctival sac	+	+	+	+	+
47	Negative Control	-	-	-	-	-
50	Negative Control	-	-	-	-	-
54	Intrapreputial	-	-	+	-	-
14	Intrapreputial	-	-	-	-	-
00	Intrapreputial	-	-	+	-	+
52	Negative Control	-	-	-	-	-
56	Negative Control	-	-	-	-	-

Anexo 5: Comprovante de submissão do Capítulo II.

Brazilian Journal of Microbiology <EvisSupport@elsevier.com>

Para: fabrinevet@yahoo.com.br

09/03/2017 em 14:47

Dear Mr. Santos,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Brazilian Journal of Microbiology

Title: Microbiological, molecular, and histopathological findings in goats experimentally infected with *Actinobacillus seminis*

Corresponding Author: Clebert Alves

Co-Authors: Fabrine Santos, Diego Costa, Aline Ferreira, Rosa Maria Pessoa, Vivianne Rocha, Robério Olinda, Antonio Flavio Dantas, Marcia Melo, Carlos Alfaro, Sergio Azevedo

Clebert Alves submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=BJM. If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at clebertja@uol.com.br.

Thank you,

Brazilian Journal of Microbiology

This message was sent automatically. Please do not reply

Responder Responder a todos Encaminhar

Anexo 6: Instruções aos autores para publicações na revista Semina: Ciências Agrárias.



Manuscript preparation

Scientific article:

Scientific articles should report results of original research on the related areas, with the sections organized in the following way: Title in English; Title in Portuguese; Abstract in English with keywords (maximum six words, in alphabetic order); Abstract in Portuguese with keywords (maximum six words, in alphabetical order); Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion, with Conclusions at the end of the Discussion or Results (Discussion and Conclusions should be written separately); Acknowledgements; Suppliers, if applicable; and Bibliographic References. The headings should be in boldface without numbering. If there is a need to include a sub-heading within a section, it should be placed in italics, and if there are further sub-topics to include under a sub-heading, these should be numbered with Arabic numerals. (Example: **Materials and Methods**, *Areas of study*, 1. *Rural area*, 2. *Urban area*.)

The submitted work cannot have been published elsewhere with the same content, except in the form of an Abstract in Scientific Events, Introductory Notes, or Reduced Format.

The work should be presented in the following order:

- 1. Title of the work**, accompanied by its translation in Portuguese, if appropriate.
- 2. Abstract and Keywords:** An informative abstract with a minimum of 200 words and a maximum of 400 words must be included, in the same language used in the text of the article, accompanied by an English translation (*Abstract and Keywords*) if the text has not been written in English.
- 3. Introduction:** The introduction must be concise and contain only the review that is strictly necessary to introduce the topic and support the methodology and discussion.
- 4. Materials and Methods:** This section may be presented in a continuous, descriptive way or with sub-headings to allow the reader to understand and be able to repeat the methodology cited with or without the support of bibliographic citations.
- 5. Results and Discussion:** *This section* must be presented in a clear way, with the aid of tables, graphs, and figures, so that it does not raise any questions for the reader with regard to the authenticity of the results and points of view discussed.
- 6. Conclusions:** *These* must be clear and presented according to the objectives proposed in the work.
- 7. Acknowledgements:** People, institutions, and companies that contributed to the work should be mentioned at the end of the text, before the Bibliographic References section.

Note:

Notes: Each note regarding the body of the text must be indicated with a superscripted symbol immediately after the phrase it concerns and must be included as a footnote at the end of the page.

Figures: The figures that are deemed essential will be accepted and should be cited in the text by their numeric order, in Arabic numerals. If any submitted illustrations have already been published, the source and permission for publication should be stated.

Tables: Tables should be accompanied by a header that will allow understanding of the data collected without the need to use the body of the text for reference.

Quantities, units, and symbols:

- a) Manuscripts should be in agreement with the criteria established in the International Codes for each subject area.
- b) Use the International System of Units in all text.
- c) Use the negative power format to note and present related units: e.g., kg ha⁻¹. Do not use the forward slash symbol to relate units: e.g., kg/ha.
- d) Use a simple space between units: g L⁻¹, not g.L⁻¹ or gL⁻¹.
- e) Use 24-hour time representation with four digits for the hours and minutes: 09h00, 18h30.

8. In-text author citations

Citations must be followed by the year of publication, and multiple citations should follow the alphabetical order system, according to the following examples:

- a) The results by Dubey (2001) confirmed that
- b) According to Santos et al. (1999), the effect of nitrogen
- c) Beloti et al. (1999b) assessed the microbiological quality
- d) [...] and inhibit the test for syncytium formation (BRUCK et al., 1992).
- e) [...] compromising the quality of its derivatives (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citations with two authors

In citations of sources that have two authors, the authors' names are separated by a semicolon when citing them within parentheses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Use *and* when the authors are included in the sentence rather than cited in parentheses.

Ex: Pinheiro and Cavalcanti (2000).

Citing more than two authors

Indicate the first author followed by the expression et al.

Within parentheses, separate references with a semicolon when more than one reference is cited.

Ex: (RUSSO et al., 2000) or Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Citing multiple documents by the same author, published in the same year

Add lowercase letters, in alphabetical order, after the date and without a space.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

Citing multiple documents by the same author, published in different years

Separate the dates with a comma.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Citing various documents by various authors, mentioned simultaneously

Place the citations in alphabetical order, separated by a semicolon.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. References: The references, according to the standard NBR 6023, Aug. 2000, and reformulation number 14.724 of the Brazilian Technical Standards Association (ABNT), 2011, must be listed in alphabetical order at the end of the manuscript. **All the authors participating in a referenced study must be mentioned, regardless of the number of participants.** The accuracy and adequacy of references for works that have been consulted and mentioned in the text of the article, as well as opinions, concepts, and statements, are entirely the responsibility of the authors.

Note: Consult recently published issues of *Semina: Ciências Agrárias* for more details about how to format references in the article.

Anexo 7: Comprovante de submissão do Capítulo I.

De: "Odilon Vidotto" <vidotto@uel.br>

Enviada: 2017/03/07 18:32:57

Para: clebertja@uol.com.br

Assunto: [SCA] Submission Acknowledgement

Clebert Clebert Jose Alves:

Thank you for submitting the manuscript, "SOROPREVALÊNCIA E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS UTILIZADAS NO DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE OVINA NO

BRASIL" to Semina: Ciências Agrárias. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/author/submission/28446>

Username: clebert

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Odilon Vidotto

Semina: Ciências Agrárias

Editor Chefe

Odilon Vidotto

Semina Ciências Agrárias

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias>