

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE PCR GÊNERO-
ESPECÍFICA, PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA E NESTED
PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS***

LUCIANA FACHINI DA COSTA

Botucatu - SP

Junho 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE PCR GÊNERO-
ESPECÍFICA, PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA E NESTED
PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS***

LUCIANA FACHINI DA COSTA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Jane Megid
Coorientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Botucatu - SP
Junho 2010

Costa, Luciana Fachini da.

Avaliação comparativa entre PCR gênero-específica, PCR espécie-específica e nested PCR espécie-específica no diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* / Luciana Fachini da Costa. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Jane Megid

Co-orientador: Renato de Lima Santos

Capes: 50502034

1. Reação em cadeia em polimerase. 2. Sêmen. 3. Urina.

Palavras-chave: *Brucella ovis*; Espécie-específica; Gênero-específica; Nested PCR; PCR; Sêmen; Urina.

Nome do autor: Luciana Fachini da Costa

Título: AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE PCR GÊNERO-ESPECÍFICA,
PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA E NESTED PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA NO
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Jane Megid

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Luis Antônio Mathias

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução animal

FCA– UNESP – Jaboticabal

Data de defesa: 29 de Junho de 2010

“A vida é um mistério – resolva-o

A vida é um desafio – enfrente-o

“A vida é amor – desfrute-o” (Madre Teresa)

“A sabedoria não nos é dada, é preciso descobri-la por nós
mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou
fazer por nós” (Marcel Proust)

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela o
oceano será menor” (Madre Teresa)

Dedico este trabalho

Ao Pai e ao Filho. Agradeço pela oportunidade desta vida e pelo aprendizado que ela me proporciona.

Aos que me ensinam sempre sobre o amor, e sobre a superação, meus pais, Vera Lucia e Nilson, meus irmãos, Andréa e Moacyr, meus sobrinhos, Guilherme e Camilia, meu padrinho, Carlos Eduardo, e meus cunhados, Fábio e Daniela.

Aos amigos que me ensinam o valor de um abraço e um sorriso.

Aos que de alguma forma introduzem-se em minha vida e agregam conhecimento, valor e experiência na minha jornada. Trago sempre gratidão pelos gestos.

Aos que me ensinam a suportar o não. Aos que me ensinam a valorizar o sim. Aos que me ensinam sobre o amor divino, aos que me ensinam sobre a importância do perdão sincero.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de antemão a Deus, pela sua misericórdia e bondade. Por governar minha vida e meu coração.

A toda minha família pelo apoio e dedicação. Por todos os exemplos, por não cansarem de dar a mim sempre motivos de grande orgulho.

À Professora Jane Megid, pela oportunidade deste mestrado. Por confiar sem ter conhecimento prévio de mim, num mundo em que se preza a desconfiança. Por todo o conhecimento.

Ao Professor Renato de Lima Santos, por todo o conhecimento que transmite. Pelas lições de determinação e esforço que aplica diariamente. Por mostrar que por um objetivo maior de engrandecimento como ser humano não há limitações ou obstáculos insuperáveis.

Aos Professores Paulo Francisco Domingues e José Paes de Almeida Nogueira Pinto, por servirem a mim como bons exemplos de profissionais e educadores.

Aos amigos de trabalho de Botucatu, João Marcelo, Joseane, Camila, Susan, Marina, Gustavo. Devo a vocês momentos de grande alegria.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Ana, Adriana, Wanderley e Sérgio, pela dedicação e pelos serviços que me auxiliaram durante o período de pós-graduação. Ao funcionário da secretaria de Pós-Graduação José Roberto, pela maneira como associa eficiência e gentileza em seu trabalho, serviu-me como excelente exemplo de ser humano.

Aos amigos de trabalho de Belo Horizonte, Mariana, Teane, Érica, Tatiane, Valéria, Custódio, Sílvia, Ana Patrícia, Juliana e Adriana. É muito prazeroso trabalhar ao lado de vocês e cativar a cumplicidade.

Aos meus grandes amigos e irmãos de Botucatu, Renata, Cristiane, Liliane, Luciana, João Marcelo, Carmo, Selene, Leila e Vanessa, por construírem comigo esta história. Por todos os momentos, por se fazerem tão especiais em minha vida.

Aos meus grandes amigos e também irmãos que ganhei em Belo Horizonte, na casa do seu João. Não foi por acaso que entraram em minha vida, tampouco porque permanecem. Agradeço por cada instante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo Auxílio que possibilitou a execução deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para PCR neste estudo.....	21
Tabela 2: Frequência de concordância e valores de kappa para os métodos de PCR utilizando primer gênero-específico (PCR gênero-específica), <i>primer</i> espécie-específico (PCR espécie-específica) e nested PCR para <i>B. ovis</i> em sêmen de ovinos.....	23
Tabela 3 Frequência de concordância e valores de kappa para os métodos de PCR utilizando primer gênero-específico (PCR gênero-específica), <i>primer</i> espécie específico (PCR espécie-específica) e nested PCR para <i>B. ovis</i> em urina de ovinos.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentual de resultados positivos e negativos para <i>Brucella ovis</i> em PCR gênero-específica, espécie-específica e nested PCR em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com <i>B. ovis</i> REO 198.....	22
Figura 2: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e espécie-específica em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com <i>B. ovis</i> REO 198.....	24
Figura 3: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e nested PCR em amostras de sêmen de ovinos	

experimentalmente infectados com *B. ovis* REO
198.....24

Figura 4: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR espécie-específica e nested PCR em amostras de sêmen de ovinos

experimentalmente infectados com *B. ovis* REO
198.....25

Figura 5: Percentual de resultados positivos e negativos para *Brucella ovis* em PCR gênero-específica, espécie-específica e nested PCR em amostras de urina de ovinos inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO
198.....26

Figura 6: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e espécie-específica em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO
198.....28

Figura 7: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e nested PCR em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO
198.....28

Figura 8: Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR espécie-específica e nested PCR em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO
198.....29

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Etiologia.....	05
2.2 Epidemiologia.....	06
2.3 Patogenia e sinais clínicos.....	09
2.4 Diagnóstico.....	11
2.4.1 Exame clínico.....	11
2.4.2 Cultivo bacteriológico.....	12
2.4.3 Exames sorológicos.....	12
2.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	14
2.5 Controle.....	16
3. OBJETIVO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Amostras de sêmen e urina de ovinos.....	17
4.2 Extração de DNA.....	18
4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase.....	19
4.4 Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
TRABALHO CIENTÍFICO	
ANEXOS.....	

DA COSTA, L.F. **Avaliação comparativa entre PCR gênero-específica, PCR espécie-específica e nested PCR espécie-específica no diagnóstico da infecção por *Brucella ovis***. 2010. 48f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo

O diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* em ovinos usualmente é realizado por meio de exame clínico, testes sorológicos e bacteriologia. Devido às limitações apresentadas pelas técnicas, o diagnóstico é geralmente obtido mediante aplicação de duas ou mais técnicas para obtenção de um resultado conclusivo. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica aplicável, pois é sensível, pouco dispendiosa, rápida, simples de ser realizada e permite o diagnóstico específico do agente infectante. Neste trabalho foram realizados dois experimentos. No primeiro compararam-se os percentuais de positividade em duas técnicas de PCR padronizadas, sendo a primeira gênero-específica e a seguinte espécie-específica, em 191 amostras de sêmen e 214 de urina provenientes de ovinos inoculados experimentalmente com a cepa de *B. ovis* REO 198. Posteriormente, desenvolveu-se a nested PCR a partir do produto amplificado da reação espécie-específica, e o percentual de positividade obtido pela nested PCR foi comparado aos obtidos pelas PCRs gênero-específica e espécie-específica. Foi observada diferença significativa no percentual de positividade ($P < 0,05$) entre PCR gênero-específica e PCR espécie-específica (24,08% e 15,18%, respectivamente) para amostras de sêmen de ovinos e concordância moderada entre os resultados destas técnicas (kappa de 0,623); para amostras de urina, não houve diferença significativa entre as positivities obtidas pela PCR gênero-específica e a espécie-específica (10,28% e 7,011%, respectivamente), e a concordância entre os resultados foi moderada (kappa de 0,6167). A nested PCR espécie-específica apresentou percentual de positividade significativamente maior ($P < 0,001$) quando comparada às PCRs gênero-específica e espécie-específica em amostras de sêmen (53,93%) e de urina (49,07%). Assim, de acordo com os resultados obtidos neste experimento, a PCR espécie-específica apresentou menor percentual de positividade frente a PCR gênero-específica, não a recomendando portanto

como técnica diagnóstica de triagem. Porém a implementação da nested PCR espécie-específica demonstrou aumento da positividade estatisticamente significativo, associado a especificidade, em amostras de sêmen e urina.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, PCR, gênero-específica, espécie-específica, sêmen, urina.

DA COSTA, L.F. **Comparative evaluation between genus-specific PCR, specie-specific PCR and species-specific nested PCR in the diagnosis of *Brucella ovis* infection.** 2010. 48f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Abstract

Diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams is routinely performed by clinical examination, serology and bacteriology. Due to limitations presented by each technique, the diagnosis is usually made by two or more techniques to obtain a conclusive result. The Polymerase Chain Reaction (PCR) has been used as a diagnostic tool applicable because it is sensitive, inexpensive, rapid, simple to perform and allows the specific diagnosis of infectious agents. In this study, the positivity percentages of two techniques of PCR previous described, one genus-specific and other species-specific, were measured in 191 semen and 214 urine samples from sheep experimentally infected with strain of *B. ovis* REO 198. Then, a species-specific nested PCR was developed from amplified products of the species-specific PCR, and the percentage of positivity obtained by nested PCR was compared to those obtained by genus and species-specific PCRs. Significant difference was observed when comparing the percentage of positivity ($P < 0.05$) between genus-specific and species-specific PCR (24.08% and 15.18%, respectively) in semen samples from sheep, and there was moderate agreement between the results of these techniques ($\kappa = 0.623$). In urine, no significant difference between the percentages of positives samples obtained by genus and species-specific PCR was observed (10.28% and 7.011% respectively) and the concordance between the results was moderate ($\kappa = 0.6167$). The species-specific nested PCR showed significantly higher percentage of positivity ($P < 0.001$) when compared to genus-specific and species-specific PCRs in semen (53.93%) and urine (49.07%). Thus, according to the results obtained in this experiment, the species-specific PCR showed the lower percentage of positivity when compared to genus-specific PCR, but the implementation of the species-specific nested PCR showed highly significant increase in positivity, associated with specificity, in samples of semen and urine. Keywords: *Brucella ovis*, PCR, genus-specific, species-specific, semen, urine.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose ovina é uma doença infectocontagiosa que tem sua relevância, especialmente nos países em que a criação de ovinos é importante fonte de renda. A bactéria causadora desta enfermidade, a *Brucella ovis*, é, entre inúmeros agentes, a principal causadora da epididimite contagiosa ovina. A *B. ovis* reduz os indicadores reprodutivos, aumenta o número de carneiros descartados anualmente, gera diminuição da vida reprodutiva dos machos, causa abortos, mortalidade perinatal e a consequente diminuição nos rendimentos de carne e lã por hectare (ROBLES, 2008).

A infecção por *B. ovis* tem distribuição cosmopolita (SPENCER e BURGESS, 1984; ESTEIN, 1999). No Brasil, o primeiro relato de caso ocorreu no Estado do Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1966) e prosseguiu até a atualidade (MAGALHÃES NETO e GIL-TURNES, 1996; MARINHO e MATHIAS, 1996; SILVA et al., 2003; COLETO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004; CLEMENTINO et al., 2007).

Para o controle da brucelose ovina é necessário o estabelecimento de medidas que tenham como alicerce a identificação e eliminação de animais infectados, doentes ou portadores, e o bloqueio da introdução de novos animais infectados em um rebanho. Neste aspecto, é fundamental a existência de métodos diagnósticos eficientes, rápidos e viáveis de serem executados.

Usualmente, o diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado por meio da combinação de exame clínico, isolamento da bactéria de amostras de sêmen e de tecidos e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo (ALTON et al., 1988; GRILLÓ et al., 1999). Entretanto, no exame físico, existem animais que, embora infectados, não desenvolvem lesões e/ou outros que, após apresentarem lesões crônicas da infecção, retornam ao estado normal e não apresentam alterações perceptíveis à palpação (WEBB et al., 1980). O isolamento bacteriano é uma técnica demorada e nem sempre eficiente, pois a bactéria é eliminada de forma intermitente no sêmen de animais infectados (WORTHINGTON et al., 1985, BAIGÚN et al., 2000), assim como pode não ser eliminada no sêmen de carneiros com alterações epididimárias e reação sorológica positiva (BURGESS, 1982), o que possibilita a obtenção de resultados falso-negativos neste teste, exigindo que o mesmo seja realizado de

forma seriada para uma maior confiabilidade. Quanto aos testes sorológicos existentes para *B. ovis*, as falhas geralmente estão relacionadas à sensibilidade apresentada. Essas dificuldades no diagnóstico da infecção explicam o motivo pelo qual o diagnóstico da brucelose ovina é geralmente realizado mediante o emprego de duas ou mais técnicas para a obtenção de um resultado conclusivo, o que pode exigir alto custo e ser demorado (GIL TURNES, 1998).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica aplicável, pois é altamente sensível, específica, pouco dispendiosa, rápida e simples de ser realizada (BRICKER, 2002). Esta técnica, inclusive, tem demonstrado possuir sensibilidade similar (MANTEROLA et al, 2003) ou mesmo maior que a apresentada pelo cultivo microbiológico para *B. ovis* (NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010), e possibilita a rápida identificação do patógeno em amostras de sêmen (SAUNDERS et al., 2007; NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010) e urina (NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010). Estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de determinar uma técnica de PCR que possua sensibilidade alta. Recentemente, devido ao advento do sequenciamento das principais espécies de *Brucella*, diversos métodos biomoleculares têm sido estudados, inclusive com o objetivo de obter um exame específico em determinar a espécie da bactéria infectante presente na amostra. Métodos que detectem especificamente a infecção por *B. ovis* em ovinos são de relevante importância, por exemplo, para controle dos casos de brucelose em rebanhos livres de *Brucella melitensis*, espécie de *Brucella* que também pode acometer pequenos ruminantes e é de caráter zoonótico, com o intuito de monitorar o rebanho. Xavier et al. (2010) desenvolveram uma técnica de PCR que amplifica uma região gênica que ocorre especificamente em *B. ovis*. Entretanto, esta região ocorre em menor frequência gênica quando comparada a regiões amplificadas em técnicas gênero-específicas, o que possivelmente reduz a sensibilidade do teste espécie-específico.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a PCR espécie-específica desenvolvida por Xavier et al. (2010) comparativamente à PCR gênero-específica para amostras de sêmen e urina de animais infectados experimentalmente com a cepa de *B. ovis* REO 198. Adicionalmente, pretendeu-se padronizar uma técnica de nested PCR espécie-específica e

avaliá-la de forma comparativa à PCR gênero-específica e à PCR espécie-específica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A brucelose é uma doença infectocontagiosa crônica de importância em saúde pública e em saúde animal, uma vez que pode acometer o homem e uma grande variedade de espécies animais. É causada por bactérias do gênero *Brucella*, microrganismos pertencentes à subdivisão alpha-2 da classe *Proteobacteria* (MORENO et al., 2002), Gram-negativos e intracelulares facultativos. São divididas, segundo fatores patogênicos e hospedeiros preferenciais, em seis espécies determinadas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, e *B. neotomae* (VERGER et al., 1987). Há relatos recentes de isolamento de *Brucella* em mamíferos marinhos e as amostras obtidas foram classificadas como *B. maris* (JAHANS et al., 1997), e mais recentemente divididas em duas espécies, conforme sua preferência pelo hospedeiro: *B. pinnipedialis* e *B. ceti* (CLOECKAERT et al., 2001; FOSTER et al., 2007). Também foi isolada uma nova espécie da bactéria em um roedor (*Microtus arvalis*) denominada *Brucella microti* (SCHOLZ et al., 2008).

Em ovinos, a brucelose possui como agente etiológico principal a *Brucella ovis*, bactéria com morfologia cocobacilar, Gram-negativa, imóvel, não capsulada, não esporulada e de tamanho pequeno, com aproximadamente 0,4 a 2,5 µm de comprimento por 0,4 a 0,8 µm de largura. Em meio sólido, como ágar tripticase soya, enriquecido com soro equino, bovino ou ovino em concentração final de 5 a 10% e em ambiente com 5 a 10% de CO₂, as colônias são perceptíveis entre três a cinco dias de incubação e apresentam por volta de 2 mm de diâmetro, forma circular e convexa, de coloração variando de branco a marrom (ALTON et al., 1988). A superfície da bactéria tem forma rugosa, por não possuir a cadeia O nos lipopolissacarídeos de sua parede celular (BLASCO, 1990).

Apesar de ser considerada de menor relevância quando comparada às outras bactérias do mesmo gênero, devido ao fato de não ser zoonótica, a *B.*

ovis tem sua importância relacionada aos prejuízos econômicos que causa, principalmente para produtores em que a criação de ovinos é principal fonte de renda. A bactéria é, entre inúmeros agentes, a principal causadora da epididimite contagiosa ovina; devido a isso é inclusive admitido esse termo, embora errôneo, como sinônimo da brucelose ovina. A *B. ovis* reduz os índices reprodutivos, aumenta anualmente o número de carneiros não aptos à atividade reprodutiva, gera diminuição da vida reprodutiva dos machos, abortamentos, mortalidade perinatal e a conseqüente diminuição nos rendimentos de carne e lã (ROBLES, 2008).

2.2 Epidemiologia

Descrita inicialmente por Buddle e Boyes (1953) na Nova Zelândia, a infecção tem atual distribuição cosmopolita e tem sido diagnosticada em praticamente todos os países onde a ovinocultura é atividade de importância econômica (SPENCER e BURGUESS, 1984; ESTEIN, 1999).

Há vários trabalhos referentes à frequência de animais reagentes ao teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), realizados em ovinos de diversas regiões do mundo. Neles, a taxa relacionada à quantidade de animais positivos foi variável e situada entre 2,4 e 27,8% em rebanhos de ovinos analisados (TAMAYO et al., 1989; ROBLES et al., 1993; MARCO et al., 1994; SERGEANT, 1994; KUMAR et al., 1997; TORRES et al., 1997; ESTEIN et al., 2002).

No Brasil, a infecção por *B. ovis* foi descrita e diagnosticada em várias localidades. A epididimite causada por *B. ovis* foi primeiramente relatada no Estado do Rio Grande do Sul, pelo isolamento do agente em oito epidídimos que apresentavam lesões clínicas. A infecção foi conseqüência da aquisição de ovinos infectados provenientes de países nos quais a bactéria havia sido diagnosticada (RAMOS et al., 1966).

Ainda no Estado do Rio Grande do Sul, foram examinados soros de 1.638 ovinos machos pela IDGA e realizada a avaliação clínica do trato genital dos animais. Os autores obtiveram 13,4% dos animais com anticorpos anti *Brucella ovis* e 9,8% com manifestações clínicas condizentes com o quadro da doença gerado pela bactéria (MAGALHÃES NETO e GIL-TURNES, 1996).

Em Santa Catarina, 18,84% dos animais examinados apresentaram alterações nos órgãos genitais; no entanto, nenhum desses animais reagiu positivamente na IDGA para *B. ovis* (SCHÄFER et al., 1997).

Em São Paulo, Marinho e Mathias (1996) não encontraram animais positivos para *B. ovis* nos testes de IDGA, ELISA e reação de fixação do complemento (RFC), e não observaram alterações sugestivas de infecção no exame clínico. No mesmo estado, Nokazi et al. (2002) analisaram 110 soros de animais provenientes de exposição agropecuária e observaram 10,9% positivos pela técnica de IDGA, entretanto todas as amostras foram negativas quando submetidas ao exame com 2-mercaptoetanol.

Os dados sorológicos recentes foram obtidos na região Nordeste, que detém atualmente 49% do rebanho ovino nacional, e cuja maior parte dos criatórios está inserida na zona semiárida. Os percentuais obtidos foram de 35% e 11,3%, no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004), e 17,5 %, em Pernambuco (COLETO et al., 2003), de animais positivos na IDGA. No semiárido da Paraíba, 5,57% dos animais foram positivos na IDGA e RFC (CLEMENTINO et al., 2007).

A *B. ovis* infecta de forma natural a espécie ovina, embora já tenha havido confirmação da transmissão da bactéria de carneiros infectados para cervos criados no mesmo pasto, e entre cervos infectados (RIDLER et al., 2000; RIDLER et al., 2002). Caprinos jovens e adultos podem ser infectados de forma experimental, contudo são menos susceptíveis quando comparados aos ovinos, e a infecção nessa espécie é de caráter leve e de curta duração (BURGESS et al., 1985). Na espécie ovina, os machos são mais susceptíveis à infecção que as fêmeas (TAMAYO et al., 1989)

Com relação às raças de ovinos predispostas, a Merino é considerada como mais resistente à infecção que as raças britânicas e suas cruzas, pois apresenta menor soroprevalência (SERGEANT, 1994). Quanto à idade, animais adultos são mais susceptíveis de serem infectados pela *B. ovis*, devido ao contato sexual, sendo a principal via de transmissão a venérea (BULGIN e ANDERSON, 1983; WALKER et al., 1986). A infecção em animais que ainda não tiveram contato sexual pode ocorrer, todavia, em algumas condições, sobretudo em períodos de estabulação prolongada, quando estes animais têm contato com a urina de outros já infectados. Nessas condições, a bactéria

penetra no organismo pela mucosa nasal, oral, conjuntival e pela via percutânea, quando há feridas ou escoriações (BROWN et al., 1971; ALTON et al., 1988; BULGIN, 1990). Há igualmente relato de infecção por *Brucella ovis* em animais de até quatro meses de idade (BURGESS, 1982), e de infecção epizootica em rebanhos de carneiros nunca utilizados para reprodução (BULGIN, 1990).

O carneiro infectado é a principal fonte de infecção em um rebanho, eliminando o agente principalmente pelo sêmen. Burgess (1982) salientou que a transmissão natural do agente ocorre principalmente por via venérea. Podem também se caracterizar como portas de entrada para a infecção as membranas mucosas prepucial (PLANT et al., 1986; MANTEROLA et al., 2003), retal, nasal (PLANT et al., 1986), oral (ALTON et al., 1988) e conjuntival (GRILLÓ et al., 1999), pois os carneiros têm o hábito de saltar entre si e de lambe-rem o prepúcio uns dos outros. A entrada do microrganismo por via retal é favorecida pela conduta homossexual dos machos fora da época de serviço (BULGIN e ANDERSON, 1983; BULGIN, 1990).

Como as outras espécies do gênero *Brucella*, a *B. ovis* possui como fonte de infecção adicional o sêmen contaminado utilizado em inseminação artificial (BUCKRELL, 1987). Robles et al. (1998) referem o aparecimento de problemas reprodutivos em ovinos de uma propriedade durante o período em que estes animais eram direcionados à inseminação artificial. A demonstração de anticorpos contra *B. ovis* no soro destes animais e o isolamento do microrganismo correspondente determinaram como causa da doença na propriedade.

Em fêmeas, há também referência de penetração do agente via cervicovaginal (PLANT et al., 1986), principalmente durante a cópula com um carneiro previamente infectado (PAOLICCHI et al., 1991), podendo, conseqüentemente, representar uma fonte de infecção de *B. ovis* e transmiti-la posteriormente a um carneiro susceptível (BROWN et al., 1971). As ovelhas infectadas podem eliminar o microrganismo nas secreções vaginais, constituindo um risco para os carneiros durante o período de serviço (MARCO et al., 1994). Estein (1999) refere que apesar de a ovelha se recuperar da infecção após o parto, ela elimina *B. ovis* com as secreções uterinas, a placenta e o lóquio. Envoltórios fetais e o próprio feto abortado constituem fontes de

infecção da bactéria, tanto em casos em que a fêmea foi naturalmente infectada como em que houve inoculação experimental de *Brucella ovis* (GRILLÓ et al., 1999). Há relatos de transmissão vertical de *B. ovis* em fêmeas infectadas enquanto estavam no terço médio da gestação, cujo cordeiro infectado morreu dez dias após o nascimento (GRILLÓ et al., 1999), e de infecção em cordeiros após serem amamentados com leite de fêmeas infectadas (BAIGÚN et al., 2000). Grilló et al. (1999), entretanto, analisaram 46 cordeiros que se alimentaram de leite de ovelhas infectadas e não isolaram *B. ovis* em nenhum desses animais.

2.3 Patogenia e sinais clínicos

De forma semelhante à que ocorre com as bactérias do mesmo gênero, a *B. ovis* tem a propriedade de sobrevivência e multiplicação intrafagocitária, e por isto possui resistência aos mecanismos de destruição que essas células de defesa efetuam (PAOLICCHI, 2001). Devido a esta capacidade de escape imunológico, a infecção por esta bactéria apresenta progressão lenta, em que o agente desencadeia uma infecção local que perdura por aproximadamente 30 dias na mucosa da porta de entrada. Após esse período, o processo evolui e acomete os linfonodos locais, onde o agente persiste por duas a três semanas. O estágio bacterêmico somente se instala em torno de dois meses pós-infecção, quando o microrganismo atinge o trato genital, o baço, os rins, o fígado, o pulmão e outros gânglios linfáticos e multiplica-se nesses órgãos; o agente é eliminado à medida que as células infectadas são destruídas (BIBERSTEIN et al., 1964; GIL TURNES, 1998).

Eliminação de *B. ovis* ocorre principalmente por meio do sêmen do animal infectado, de forma intermitente e por períodos prolongados (WORTHINGTON et al., 1985; PAOLICCHI et al., 1991). Paolicchi et al. (1991) obtiveram cultivos de sêmen positivos para *B. ovis* até oitenta semanas pós-infecção experimental.

Os principais órgãos afetados na maioria dos carneiros infectados são o epidídimo e as glândulas sexuais acessórias, sendo as lesões concentradas principalmente no epidídimo (BURGESS, 1982). A cauda do epidídimo é o local em que se observa maior alteração, geralmente unilateral, que passa a apresentar consistência firme à palpação. O aumento da cauda desse órgão

caracteriza cronicidade da doença (CAMERON e LAUERMAN, 1976; SEARSON, 1982; FOSTER et al., 1989; BLASCO, 1990; WEST et al., 1993). Alterações macroscópicas geralmente são observadas nos epidídimos apenas após a formação de granulomas espermáticos (FOSTER et al., 1987), em consequência da estase espermática e do extravasamento de conteúdo espermático para o interstício (BURGESS, 1982). Os testículos podem apresentar consistência mais flácida e sofrer atrofia em graus variáveis (BLASCO, 1990). Os sinais clínicos relacionados à doença são pouco evidentes nas glândulas acessórias, embora possam ser acometidas, especialmente a vesícula seminal, que pode apresentar aumento de volume, com ductos preenchidos por líquidos. As glândulas bulbouretrais, a próstata e a ampola do ducto deferente normalmente não apresentam alterações significativas (FOSTER et al., 1987).

Embora *B. ovis* cause epididimite, existem carneiros infectados que não desenvolvem a doença de forma perceptível à palpação. Mesmo em animais que apresentam os sinais clínicos relacionados à doença, a reversão dos sinais é frequentemente observada, a ponto de o animal ser considerado clinicamente normal (BURGESS, 1982; WORTHINGTON et al., 1985, PLANT et al., 1986).

Em função da epididimite, a qualidade do sêmen e a fertilidade dos animais encontram-se alteradas (KOTT et al., 1988; BULGIN, 1990; ROBLES et al., 1998). Há migração de células inflamatórias para o sêmen (WEBB et al., 1980), reduz-se a concentração espermática, com diminuição total do volume espermático produzido pelo macho, ocorre redução da motilidade dos espermatozoides no ejaculado e aumento do percentual de anormalidades morfológicas apresentadas nessas células (CAMERON e LAUERMAN, 1976; RIDLER et al., 2002).

Sinais clínicos sistêmicos e relacionados à fase inicial da doença, como febre, hiporexia ou apetite caprichoso, enfraquecimento e taquipneia podem ocorrer, mas são pouco frequentes, o que dificulta o diagnóstico clínico em fase aguda da doença (ROBLES, 2008).

Nas fêmeas não gestantes, a *B. ovis* pode produzir vaginocervicite e endometrite, acarretando em infertilidade temporária. Nas gestantes, a infecção produz bacteremia, e a bactéria torna a multiplicar-se no trato genital a partir da

segunda metade do período de gestação, podendo causar placentite, quadros de abortamento e mortalidade perinatal de cordeiros (ESTEIN, 1999).

2.4 Diagnóstico

Para o controle da enfermidade, é necessário o estabelecimento de medidas de controle, que têm como alicerce a identificação e eliminação de animais infectados com a bactéria e o bloqueio da introdução de novos animais infectados em um rebanho. Para que essas medidas sejam implantadas, são necessários métodos diagnósticos que sejam eficientes, rápidos e viáveis de serem executados.

Usualmente, o diagnóstico da infecção por *B. ovis* é realizado pela combinação de exame clínico, isolamento da bactéria de amostras de sêmen, tecidos e detecção de anticorpos anti-*B. ovis* em soro sanguíneo (ALTON et al., 1988; GRILLÓ et al., 1999).

2.4.1 Exame clínico

O exame clínico consiste na inspeção da parte externa dos órgãos genitais dos ovinos e palpação escrotal. A palpação de testículo e epidídimo demonstra ser uma técnica de grande utilidade no diagnóstico da doença (WEBB et al., 1980). Embora não permita aferir qual o agente causador da epididimite, uma vez que as alterações clínicas causadas pelos diferentes microrganismos que desencadeiam a epididimite contagiosa ovina são similares na maioria das vezes (HUGHES e CLAXTON, 1968), esta técnica diagnóstica permite uma triagem dos animais passíveis de estarem infectados pela *B. ovis* e possui baixo custo. Este procedimento, contudo, tem eficácia limitada, já que existem animais que, embora infectados, não desenvolvem lesões, assim como animais que após apresentarem lesões crônicas da infecção, retornam ao estado normal e não apresentam alterações perceptíveis à palpação (WEBB et al., 1980). O sêmen também pode ser examinado com o objetivo de avaliar diminuição da motilidade, presença de anormalidades espermáticas e também determinar o perfil inflamatório, por meio da visualização de células inflamatórias presentes (BURGESS, 1982).

2.4.2 Cultivo bacteriológico

Alguns autores recomendam a utilização do cultivo bacteriológico do sêmen, como complemento ao exame clínico, e realização de testes sorológicos antes da estação de monta (PAOLICCHI et al., 1991), pois a identificação da bactéria no sêmen é um indicador confiável da presença de infecção (WEBB et al., 1980). A bactéria, entretanto, é eliminada de forma intermitente no sêmen de animais infectados (WORTHINGTON et al., 1985, BAIGÚN et al., 2000), ou pode nem mesmo ser eliminada no sêmen de carneiros com alterações epididimárias e reação sorológica positiva (BURGESS, 1982), o que possibilita o aparecimento de animais falso-negativos no cultivo bacteriológico. Por esses fatores, é recomendado o processamento de amostras de forma seriada, sendo três a quatro amostras de sêmen coletadas em intervalos semanais, visando aumentar a possibilidade de êxito diagnóstico (BLASCO, 1990).

2.4.3 Exames sorológicos

Existem vários métodos sorológicos que visam detectar anticorpos anti-*Brucella ovis*; dentre os mais utilizados destacam-se IDGA (MYERS e SINIUK, 1970), RFC (WORTHINGTON et al., 1985; MARÍN et al., 1989; HILBINK et al., 1993) e ELISA (VIGLIOCCO et al., 1997).

A IDGA é prova de referência em países da América do Sul, como Chile, Argentina, Brasil, Peru e Uruguai. Este teste utiliza antígeno de extrato salino, constituído por lipopolissacarídeos rugosos e proteínas da membrana externa da *Brucella* (OIE, 1996), ou antígeno citoplasmático, e baseia-se na formação de complexo antígeno-anticorpo insolúvel que se precipita no gel, formando uma linha de precipitação visível após 72 horas de incubação (MYERS e SINIUK, 1970). O exame é capaz de detectar a presença de anticorpos a partir da 6ª à 12ª semana pós-infecção (JOHNSON e WALKER, 1992).

Considerada simples, de baixo custo e de fácil interpretação (MYERS e SINIUK, 1970), a IDGA é, entretanto, uma técnica que pode gerar reações falso-positivas, nos casos em que se utiliza antígeno de parede celular, uma vez que é possível a ocorrência de reações cruzadas com outras bactérias (JOHNSON e WALKER, 1992); ou menor sensibilidade, nas reações em que utiliza um antígeno proteico citoplasmático (JOHNSON e WALKER, 1992).

Em países como Austrália e Nova Zelândia, o diagnóstico e descarte de animais infectados por *B. ovis* é realizado pela associação da palpação escrotal dos animais e com a sorologia utilizando a reação de fixação do complemento (RFC) (NILO, 1984). Os complicadores relacionados à RFC são a complexidade do teste e a possibilidade de fenômeno de prozona (RIS e TE PUNGA, 1963).

Nos últimos anos, a técnica de ELISA indireta foi estudada, com a utilização de diferentes extratos antigênicos. As provas de ELISA apresentaram maior sensibilidade e especificidade quando comparadas às demais provas sorológicas (WORTHINGTON et al., 1984; BLASCO, 1990). Outras vantagens deste método estão no fato de permitir processamento de grande número de amostras e utilizar quantidades mínimas de reagentes e de soro animal (ROBLES, 2008). Entretanto, para realização desta técnica é necessário um leitor de placas para a obtenção de resultados de forma adequada. Os resultados ainda não possuem uma padronização internacional de interpretação, o que dificulta sua utilização rotineira (WORTHINGTON et al., 1984, ESTEIN, 1999).

A dificuldade de obtenção de teste sorológico com boa sensibilidade é a explicação para que o diagnóstico da brucelose ovina seja geralmente realizado mediante a aplicação de duas ou mais técnicas para um resultado conclusivo, o que pode acarretar alto custo e ser demorado (GIL TURNES, 1998).

2.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para o controle epidemiológico ideal da doença, melhor seria admitir inicialmente a utilização de um teste de triagem nos animais de um rebanho em que se detectasse um pequeno número de animais infectados dentro de uma população grande de animais. Para tanto, a sensibilidade do teste seria mais importante que sua especificidade, assim como o baixo custo, a rapidez e a facilidade para realização do mesmo. O teste de triagem deveria ao menos identificar o gênero da bactéria causadora da infecção. A etapa seguinte de diagnóstico seria a confirmação definitiva do microrganismo, portanto o teste teria como função determinar a espécie de *Brucella* responsável pela infecção, e diferenciar as cepas vacinais das de campo (BRICKER, 2004).

Adicionalmente, devido à possibilidade de a inseminação artificial servir como fonte de infecção a um rebanho, existe a preocupação também em avaliar o estado sanitário do macho utilizado como doador de sêmen, pela aplicação de técnicas que indiquem a presença de *B. ovis* no sêmen desses animais, e assim direcionar apenas machos livres de infecção para colheita do material biológico (BUCKRELL, 1987).

Neste contexto, em que há obstáculos referentes à admissão de provas para detecção da infecção por *B. ovis* que sejam eficientes e confiáveis, surgem estudos que propõem a utilização de técnicas moleculares, baseadas na PCR, como uma alternativa aplicável. A PCR tem facilitado a detecção de bactérias, particularmente as que são de lento crescimento em culturas, e tem permitido a diferenciação entre as espécies da bactéria estudada (BRICKER, 2002). Esta técnica é altamente sensível, muito específica, pouca dispendiosa, rápida e simples. Contudo que haja cuidado e atenção relacionados a possíveis contaminações entre as amostras, o método é considerado confiável e pode ser facilmente introduzido como exame em um laboratório devidamente equipado (BRICKER, 2002).

Em amostras provenientes de animais suspeitos, a PCR é utilizada como técnica gênero específica, e vem sendo avaliada como ferramenta diagnóstica para diferenciação também da espécie da bactéria presente e/ou biovares da mesma. Utilizam-se diversos tipos de amostras como soro, sangue, leite, sêmen e órgãos dos animais suspeitos (ROMERO e LOPEZ-GOÑI, 1999; CORTEZ et al., 2001; HAMDY e AMIN, 2002; MANTEROLA et al., 2003; O'LEARY et al., 2006; SAUNDERS et. al., 2007). Os *primers* utilizados na técnica derivam de diferentes sequências de genes estudadas e determinadas no genoma da *Brucella* como, por exemplo, as inserções designadas 16S rRNA (HERMAN e DE RIDDER, 1992, ROMERO et al., 1995), proteína de membrana externa de 31KDA (BAILY et al., 1992; GALLIEN et al., 1998) e proteína de membrana de 43 KDA (FEKETE et al., 1992).

Em razão do genoma da *Brucella spp.* ser fortemente conservado entre as espécies, a maioria das PCRs aplicadas são gênero-específicas. As técnicas que diferenciam as espécies são mais complexas e difíceis de serem realizadas (BRICKER, 2002).

Bricker e Halling (1994) pesquisaram uma PCR que amplifica o alvo determinado como IS711, também conhecido como IS6501 (OUAHRANI et al., 1993). Este sítio, presente exclusivamente no genoma de bactérias do gênero *Brucella*, é bem conservado e possui múltiplas cópias, algumas cujas localizações são variáveis e relacionadas a determinadas espécies. Há técnicas moleculares que objetivam essa sequência como alvo de amplificação. (BRICKER e HALLING, 1994). Denominada AMOS-PCR, estas técnicas empregam um *primer* comum que ancora na região do elemento IS comum a todas as espécies, e um *primer* espécie-específico, que se liga à sequência única determinada em uma espécie de *Brucella*. Os *primers* são escolhidos de forma que o tamanho do fragmento obtido determine a qual espécie de *Brucella* ele pertence, e são capazes de identificar *Brucella abortus*, *B. melitensis*, biovar 1 de *B. suis* e *B. ovis* (BRICKER e HALLING, 1994).

Manterola et al. (2003) utilizaram desse mesmo elemento de inserção denominado IS6501, que apresenta no genoma da *B. ovis* 836 pares de bases de sequência de nucleotídeos e repete-se mais que nas demais espécies (OUAHRANI et al., 1993), para elaborar uma PCR para o diagnóstico da *B. ovis* em amostras de sêmen de ovinos. Nesse estudo, em que a PCR foi comparada com a bacteriologia e testes sorológicos, 50% dos animais com evidências sorológicas de infecção por *B. ovis* foram positivos em culturas de sêmen, e 51,9% foram positivos na PCR. Quando comparados os resultados obtidos de cultura de sêmen e PCR em 192 amostras de sêmen testadas, houve elevada concordância entre os testes. Assim, os autores concluíram que a PCR possuía sensibilidade similar à bacteriologia e poderia ser utilizada como ferramenta complementar ao diagnóstico de infecção por *B. ovis* em ovinos. A técnica de PCR desenvolvida, entretanto, não é específica para a *B. ovis*, uma vez que pode resultar em positividade também em amostras infectadas por *B. melitensis* ou *B. abortus*.

Saunders et al. (2007) desenvolveram uma PCR multiplex capaz de detectar *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis* em sêmen de carneiros. O teste foi igualmente sensível para detecção de *B. ovis* quando comparado à bacteriologia.

Por meio do sequenciamento completo do genoma da amostra de referência ATCC25840 da *B. ovis*, Tsolis et al. (2009) identificaram um

segmento do cromossomo II que possui 28 ORFs que são ausentes nas demais espécies de *Brucella* já sequenciadas. Xavier et al. (2010) selecionaram 12 das 28 ORFs e desenvolveram uma PCR específica para *B. ovis*. Observou-se que, quando utilizadas amostras de DNA de espécies clássicas do gênero *Brucella*, de outras espécies de bactérias causadoras de epididimite em ovinos ou de amostras de DNA de microrganismos filogeneticamente relacionados à *B. ovis*, não houve amplificação de produtos de PCR. Ademais, houve positividade quando 18 cepas distintas de *B. ovis* foram utilizadas na técnica, demonstrando a especificidade da PCR desenvolvida. Os valores de sensibilidade do método foram considerados similares aos obtidos pela bacteriologia. Os autores concluíram que o método desenvolvido poderia ser empregado no diagnóstico de rotina da brucelose ovina.

2.5 Controle

Para controle da brucelose ovina, são necessárias a identificação e a eliminação dos animais sorologicamente positivos e/ou dos que possuem epididimite clínica, além da não introdução de animais infectados em um rebanho livre (ESTEIN, 1999). O controle sanitário mediante o sacrifício dos animais infectados se aplica em países com baixa prevalência da infecção (FENSTERBANK et al., 1982). Em alguns países aplica-se o controle misto, em que há combinação de controle sanitário com a vacinação (ESTEIN, 1999); isso ocorre principalmente em países em que há elevada prevalência de infecção por *B. ovis*, pois a erradicação por meio do uso de provas sorológicas e eliminação de animais infectados é economicamente inviável (BLASCO, 1990).

A vacinação, entretanto, pode interferir no diagnóstico sorológico (BLASCO et al., 1987).

Portanto, para que exista um controle efetivo da brucelose ovina no Brasil, a medida ideal é o conhecimento da epidemiologia desta doença e a identificação e eliminação de animais doentes e portadores (CLEMENTINO et al., 2007).

3.OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a PCR espécie-específica desenvolvida por Xavier et al. (2010), comparativamente à PCR gênero-específica para amostras de sêmen e urina de animais infectados experimentalmente com a cepa de *B. ovis* REO 198. Adicionalmente, pretendeu-se padronizar uma técnica de nested PCR espécie-específica e avaliá-la de forma comparativa à PCR gênero-específica e à PCR espécie-específica.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de sêmen e urina de ovinos:

Foram analisadas 191 amostras de sêmen e 214 amostras de urina, todas provenientes de animais sorologicamente positivos após a inoculação experimental com a cepa de *Brucella ovis* REO 198 em experimento desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP-Botucatu por Nozaki (2008).

4.2 Extração de DNA

A extração do material que foi utilizado para este estudo foi processada, de acordo com o descrito por Nozaki (2008).

Para sêmen, aproximadamente 500 µL da amostra colhida foram adicionados a 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0), incubados a 80°C por 10 minutos e centrifugados a 13.000xg durante 15 minutos. O sobrenadante obtido por esses procedimentos foi desprezado e foram realizadas sucessivas lavagens, repetidas por 2 a 3 vezes, até que o sobrenadante ficasse límpido. Após as lavagens, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de solução tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0, constituída por 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 µL SDS 10% e 10 µL proteinase K a 20 mg/mL, e incubado a 37°C por 24 horas. A fase aquosa contendo o ácido nucleico foi extraída utilizando o

método de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (BAILY et al., 1992; CORTEZ et al., 2001; KEID et al., 2007). O precipitado (pellet) foi ressuspensionado em 30 µL de TE pH 8,0 e incubado a 56°C por 30 minutos.

Para urina, aproximadamente 500 µL da amostra foram descongelados, adicionados a 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0) e centrifugados a 13.000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado conforme protocolo citado para extração de sêmen.

A extração de DNA de amostras de bactérias utilizadas como controle positivo das reações de PCR foi realizada ressuspensionando a cultura em 567 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0), seguido de adição de tampão de extração contendo 30 µL de sódio duodecil sulfato (SDS) 10% e 3 µL de proteinase K (20mg/mL) (Invitrogen, Brasil) e incubação a 55°C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e, após agitação, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl, seguido de uma segunda incubação a 65 °C por 10 minutos. O restante do processo foi realizado pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (SAMBROOK, 1989).

Todo o material extraído e utilizado neste estudo foi estocado a -20°C até o momento da reação.

4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase

Foram realizados três protocolos distintos para amplificação das amostras de sêmen e urina, sendo todas as amostras avaliadas pelos três protocolos.

Para a técnica da PCR gênero-específica, os *primers* utilizados foram o ISP1 e ISP2, listados na Tabela 1, designados para a sequência de nucleotídeos da *Brucella* IS6501 (MANTEROLA et al., 2003). As reações foram realizadas segundo Keid et al. (2007), com um volume de 25 µL, contendo concentração final de 1X do tampão de reação, 200µM de cada dNTP, 1mM MgCl₂, 2,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL) 5U/µL de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil) e 2,5 µL do DNA extraído. Água MilliQ autoclavada foi utilizada como controle negativo e DNA extraído de colônia pura de *B. ovis* como controle positivo. O processo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 35 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 45

segundos, e uma fase final para extensão a 72°C por 6 minutos (MANTEROLA et al., 2003). A análise do produto amplificado obtido por esta técnica foi realizada por meio de eletroforese em gel de ágar a 2% (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) 1X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0). As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular, sendo consideradas positivas aquelas cujo peso aproximava-se da marcação de 700 pares de bases (bp).

Para a técnica da PCR espécie-específica, o par de *primers* utilizado foi o correspondente ao A0503, identificado na Tabela 1 (XAVIER et al., 2010). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 23 µL de mix de PCR comercial (Supermix, Invitrogen, Brasil), 0,5 µL de cada *primer* (25pmol/µL), 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil) e 2,5 µL do DNA extraído. Água MilliQ autoclavada foi utilizada como controle negativo, e DNA extraído de colônia pura de *B. ovis*, como controle positivo. O processo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma fase final para extensão a 72°C por 5 minutos. A análise do produto amplificado foi realizada da mesma forma que a citada acima, para a técnica gênero-específica. As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular e foram consideradas positivas aquelas com peso molecular próximo de 228 bp.

Para a técnica da nested-PCR, o par de *primers* utilizado foi o correspondente ao N0503, identificado na Tabela 1. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 23 µL de mix de PCR comercial (Supermix, Invitrogen, Brasil), 0,5 µL de cada *primer* (25pmol/µL), 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil) e 2,5 µL do DNA extraído. Água MilliQ autoclavada foi utilizada como controle negativo, e DNA extraído de colônia pura de *B. ovis*, como controle positivo. O processo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma fase final para extensão a 72°C por 5 minutos. A análise do produto amplificado foi realizada de forma semelhante às duas anteriores, e as bandas comparadas com o padrão de peso molecular próximas de 171 bp foram consideradas positivas.

Todas as 191 amostras de sêmen e 214 de urina foram avaliadas pelas técnicas de PCR espécie-específica e gênero-específica. Entretanto, somente as que resultaram negativas na técnica espécie-específica foram analisadas pela nested PCR, uma vez que as amostras que apresentaram positividade em PCR espécie-específica seriam invariavelmente positivas em nested PCR aplicada aos produtos de suas reações.

As PCRs gênero e espécie-específicas foram realizadas em duas salas próprias, com cabines determinadas para uso em cada uma delas, uma estritamente para diluição e preparo dos reagentes da técnica e outra para eluição da amostra no eppendorf com o mix. O preparo dos reagentes para a nested PCR foi realizado na mesma sala destinada às PCRs. Para a adição da amostra da nested PCR, que já sofreu processo de amplificação, entretanto, foi utilizado outro ambiente e outra capela, para evitar contaminação laboratorial e consequente comprometimento dos resultados obtidos por PCR simples. A técnica de eletroforese, tanto para as PCRs quanto para a nested PCR, foi realizada em ambiente próprio e isolado, por se tratar de local em que se trabalha com material amplificado e contaminante.

TABELA. 1. *Primers* utilizados para PCR neste estudo.

Reação	<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Produto
Gênero-específica	ISP1F	GGTTGTTAAAGGAGAACAGC	700 bp
	ISP2R	GACGATAGCGTTTCAACTTG	
Espécie-específica	A0503F	GCCTACGCTGAACTTGCTTTTG	228 bp
	A0503R	ATCCCCCATCACCATTAACCGAAG	
Nested PCR	N0503F	ATGGGATTTGCGATCCTGA	171 bp
	N0503R	CAACCACCCAAGTGTCAGTG	

4.4 Análise estatística

A análise das proporções dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas de PCR e nested PCR foi avaliada pelo teste de qui-quadrado de McNemar. A análise de concordância entre os resultados gerados foi obtida pela estatística kappa.

Para análise estatística, todos os resultados positivos pela PCR espécie-específica foram considerados positivos para nested PCR.

5.RESULTADOS

Em amostras de sêmen, a técnica gênero-específica detectou positividade de 24,08% (46/191), o que diferiu de forma significativa ($P < 0,05$) da técnica espécie-específica, que identificou uma frequência de 15,18% (29/191) de positivos (Figura 1). Houve concordância substancial dos resultados, com valor de kappa de 0,623 (Tabela 2); 13,61% das amostras (26/191) foram positivas em ambos os testes, enquanto 74,35% (142/191) foram negativas (Figura 2). Das amostras analisadas, 10,47% (20/191) foram positivas por PCR gênero-específica e negativas pela espécie-específica, enquanto 1,57% (3/191) foram positivas pelo método espécie-específico e negativas pelo gênero-específico.

A nested PCR apresentou ainda resultados estatísticos significativamente distintos ($P < 0,001$), quando comparados com os outros dois métodos diagnósticos, pois identificou 53,93% (103/191) de amostras positivas (Figura 1). Os valores de concordância entre os testes diagnósticos analisados foram considerados razoáveis entre a PCR gênero-específica e a nested PCR e entre a PCR espécie-específica e a nested PCR, com kappa de 0,2856 e 0,2653, respectivamente (Tabela 2). Os percentuais de resultados que concordaram entre a PCR gênero-específica e a nested PCR foram de 20,42% (39/191) de amostras positivas e 42,41 % (81/191) de amostras negativas (Figura 3), respectivamente, enquanto entre PCR espécie-específica e nested PCR foram de 15,18% (29/191) de amostras positivas e 46,07% (88/191) de negativas (Figura 4). Do total de amostras, 3,66% (7/191) foram positivas pela técnica gênero-específica e negativas pela nested PCR, enquanto 33,51% (64/191) foram positivas apenas pela nested PCR e negativas pela PCR gênero-específica. Todas as amostras positivas pela PCR espécie-específica foram consideradas positivas pela nested PCR; entretanto, 38,74% (74/191) das amostras foram positivas pela nested e negativas pela PCR espécie-específica.

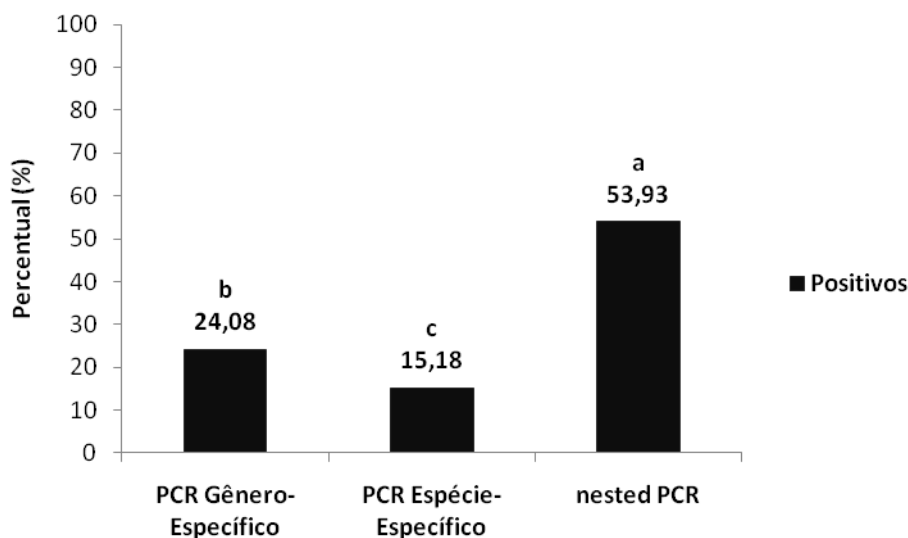


FIGURA 1. Percentual de resultados positivos para *Brucella ovis* em PCR gênero-específica, espécie-específica e nested PCR, em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Letras minúsculas diferentes indicam frequências diferentes χ^2 , $p < 0,05$).

TABELA 2. Frequência de concordância e valores de kappa para os métodos de PCR utilizando *primer* gênero-específico (PCR gênero-específica), *primer* espécie-específico (PCR espécie-específica) e nested PCR para *B. ovis* em sêmen de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198.

Métodos	N amostral	N concordância	Concordância (%)	Kappa	Intervalo de 95% de Confiança
PCR gênero-específica e PCR espécie-específica	191	168	87,96	0,623	Superior: 0,7599 Inferior: 0,4864
PCR gênero-específica	191	120	62,83	0,2856	Superior: 0,3945

e nested PCR					Inferior: 0,1768
PCR espécie- específica e nested PCR	191	117	61,26	0,2653	Superior: 0,3542 Inferior: 0,1764

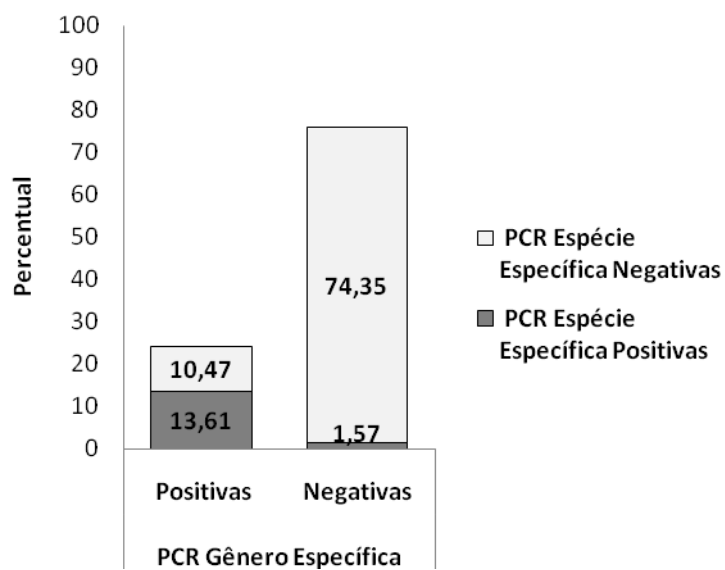


FIGURA 2. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e espécie-específica em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,623).

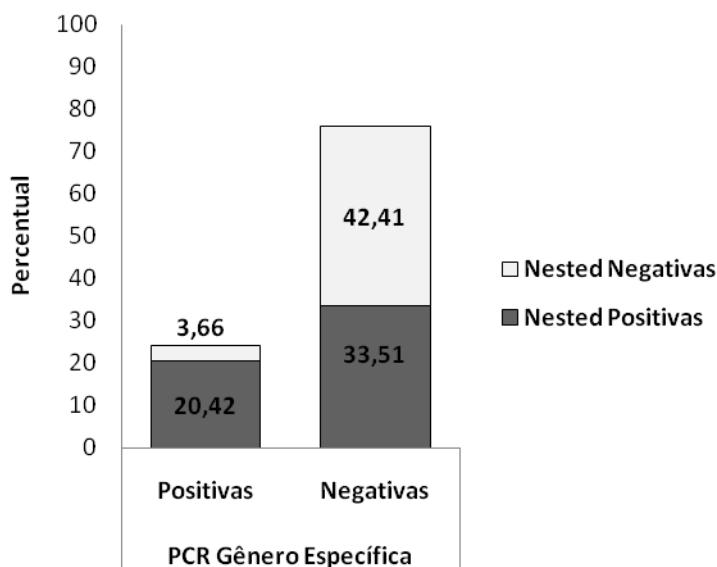


FIGURA 3. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e nested PCR em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,2856).

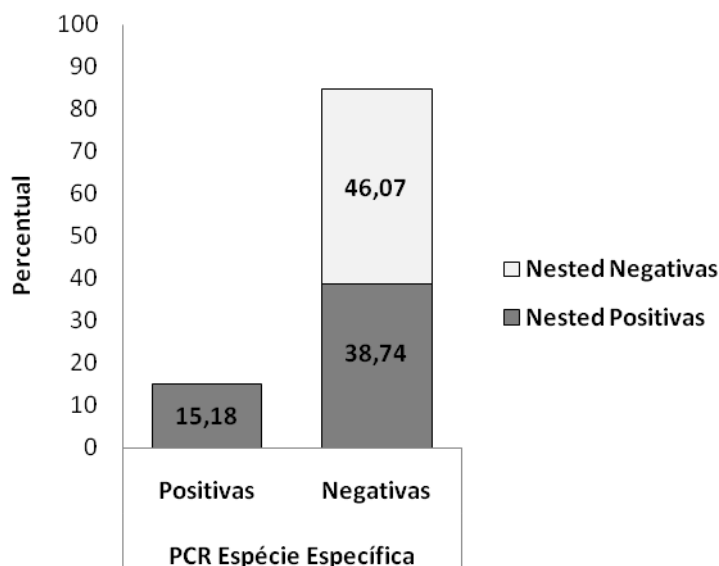


FIGURA 4. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR espécie-específica e nested PCR em amostras de sêmen de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,2653).

Em amostras de urina, a técnica gênero-específica detectou uma positividade de 10,28% (22/214). Este resultado, entretanto, não apresentou diferença estatística significativa do obtido pela técnica espécie-específica ($P=0,0522$), que detectou 7,011 % (15/214) de amostras positivas (Figura 5).

Houve concordância substancial dos resultados, com valor de kappa de 0,6167 (Tabela 3); 5,61% (12/214) das amostras foram positivas em ambas as técnicas, enquanto 88,32% (189/214) foram negativas (Figura 6). Das amostras positivas por PCR gênero-específica (10/214), 4,67% foram negativas pela espécie-específica, enquanto 1,40% (3/214) foram positivas pelo método espécie específico e negativas pelo gênero específico.

A nested PCR apresentou resultados estatísticos significativamente distintos ($P < 0,001$) quando comparados com os outros dois métodos diagnósticos, pois identificou 49,07% (105/214) de amostras positivas (Figura 5). Os valores de concordância entre os testes diagnósticos analisados foram considerados pobres entre a PCR gênero-específica e a nested PCR e entre a PCR espécie-específica e a nested PCR, com kappa de 0,1557 e 0,1451, respectivamente (Tabela 3). O percentual de resultados que concordaram entre a PCR gênero-específica e a nested PCR foram de 8,88% (19/214) de amostras positivas e 49,53 % (106/214) de amostras negativas (Figura 7), respectivamente, enquanto entre PCR espécie-específica e nested PCR foram de 7,01 % (15/214) de amostras positivas e 50,93% (109/214) de negativas (Figura 8). Do total de amostras, 1,40% (3/214) foram positivas pela técnica gênero-específica e negativas pela nested PCR, enquanto 40,19% (86/214) foram positivas apenas pela nested PCR e negativas pela PCR gênero específica. Todas as amostras positivas pela PCR espécie-específica foram consideradas positivas pela nested PCR; entretanto, 42,06% (90/214) das amostras foram positivas pela nested e negativas pela PCR espécie-específica.

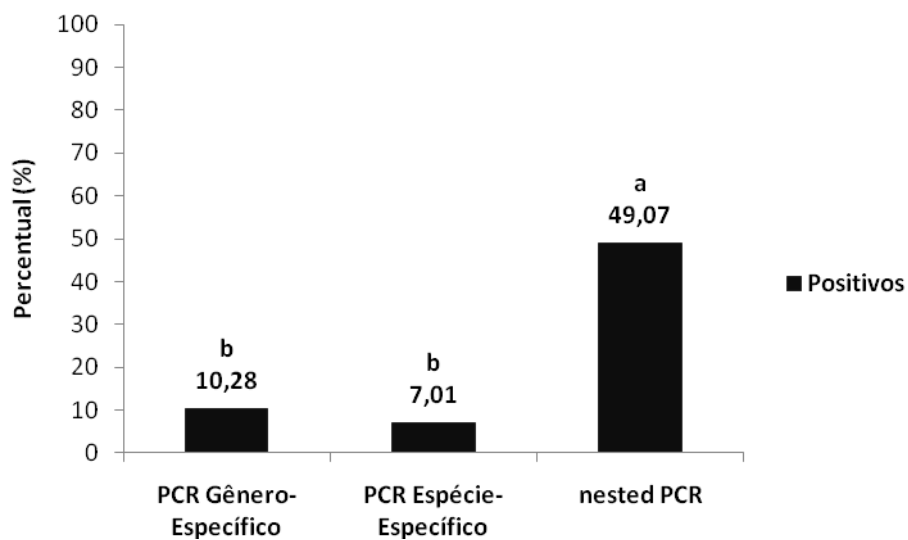


FIGURA 5. Percentual de resultados positivos para *Brucella ovis* em PCR gênero-específica, espécie-específica, e nested PCR em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Letras minúsculas diferentes indicam frequências diferentes χ^2 , $p < 0,001$)

TABELA 3. Concordância e valores de kappa para os métodos de PCR utilizando *primer* gênero-específico (PCR gênero-específica), *primer* espécie-específico (PCR espécie-específica) e nested PCR para *B. ovis* em urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198.

Métodos	N amostral	N concordância	Concordância (%)	Kappa	Intervalo de 95% de Confiança
PCR gênero-específica e PCR espécie-específica	214	204	95,32	0,6167	Superior:0,8063 Inferior: 0,427
PCR gênero-específica e nested PCR	214	124	58,41	0,1557	Superior: 0,2381 Inferior: 0,0733
PCR espécie-específica e nested PCR	214	124	57,92	0,1451	Superior: 0,2149 Inferior: 0,0754

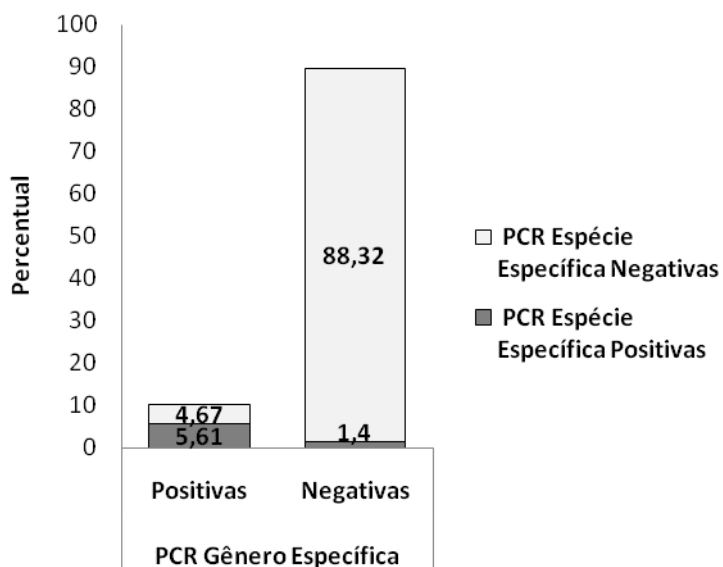


FIGURA 6. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e espécie-específica em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,6167).

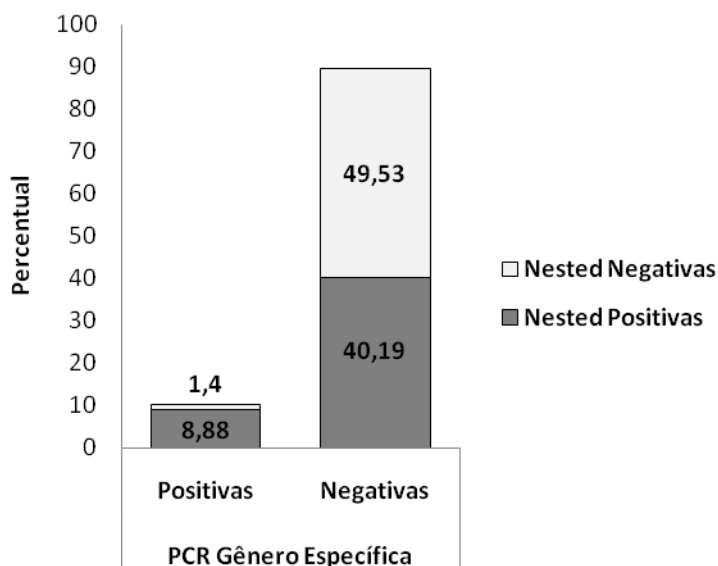


FIGURA 7. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR gênero-específica e nested PCR em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,1557).

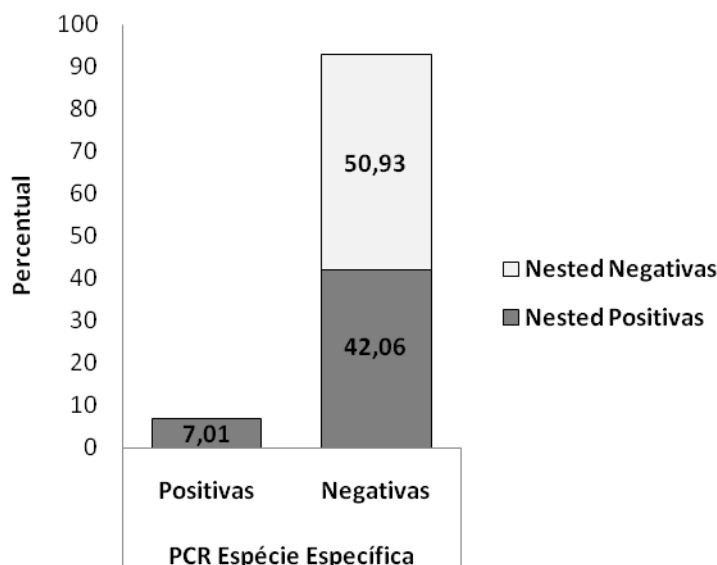


FIGURA 8. Proporção de resultados positivos e negativos e concordância entre PCR espécie-específica e nested PCR em amostras de urina de ovinos experimentalmente infectados com *B. ovis* REO 198 (Valor de kappa 0,1451).

6. DISCUSSÃO

Embora o isolamento bacteriológico seja considerado o “padrão ouro” para diagnóstico da *B. ovis*, o método tem sido contestado como melhor técnica admissível para detecção da bactéria em amostras colhidas no campo, em função do período prolongado de tempo para obtenção de resultado diagnóstico, sendo portanto pouco prático como teste em animais assintomáticos (MANTEROLA et al., 2003; NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010). A PCR tem sido admitida como excelente alternativa diagnóstica, em razão de ter demonstrado possuir sensibilidade similar (MANTEROLA et al., 2003) ou mesmo maior que a apresentada pelo cultivo microbiológico (NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010) e possibilitar a rápida identificação do patógeno em amostras de sêmen (SAUNDERS et al., 2007; NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010) e urina (NOZAKI, 2008; XAVIER et al., 2010).

A especificidade da técnica também é determinante importante para eleição de um exame diagnóstico. O fato de o método conseguir facilmente distinguir a infecção por *B. ovis* da por *B. melitensis* em ovinos é de extrema importância para controle e monitoramento do risco de brucelose em países em que os pequenos ruminantes representam a mais importante fonte de infecção

de *B. melitensis* para seres humanos. Além disso, em países livres de *B. melitensis*, um teste específico possibilita o melhor controle do rebanho de ovinos (XAVIER et al., 2010).

Neste estudo foram analisadas inicialmente duas técnicas de PCR. A PCR gênero-específica apresentou, em amostras de sêmen, percentual de positividade de 24,08% (46/191), valor este próximo do observado por Nozaki (2008), que atingiu 21,6% de amostras de sêmen positivas. A autora utilizou o mesmo par de *primers* escolhido neste estudo para amplificar a sequência referente ao gênero *Brucella*. A PCR espécie-específica forneceu 15,18% (29/191) de positividade, valor similar ao obtido por Xavier et al. (2010), de 17,9%, utilizando o mesmo *primer* com sequência direcionada especificamente à amplificação de *B. ovis*. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre as frequências de positividade dos testes gênero e espécie-específicos para amostras pareadas de sêmen ($P < 0,05$). Das 46 amostras positivas pela técnica gênero-específica, 26 (56,5%) foram positivas também pela técnica espécie-específica, resultando em índice de concordância considerado substancial, uma vez que o coeficiente kappa apresentou resultado de 0,623.

Em amostras de urina, 10,28% (22/214) foram positivas pela técnica gênero-específica, enquanto somente 7,01% (15/214) das amostras processadas resultaram positivas pela espécie-específica. O resultado referente à técnica gênero-específica foi similar ao obtido por Nozaki (2008), correspondente a 12,7% de positividade, porém difere do verificado por Xavier et al. (2010), que obtiveram 19,7% de amostras positivas. Embora o método gênero-específico tenha fornecido maior positividade, quando estatisticamente comparado ao espécie-específico, não apresentou diferença significativa ($P = 0,0522$). Dentre as 22 amostras consideradas positivas pelo método gênero-específico, 12 foram também positivas pelo método espécie-específico, e o índice de concordância entre os dois foi considerado substancial, visto que o kappa foi de 0,6167.

Os resultados obtidos sugerem maior positividade na reação de PCR gênero-específico, o que pode ser justificado pela região do genoma determinada para amplificação de cada técnica. A região IS711 ocorre 37 vezes no genoma da *B. ovis*, enquanto a ORF designada como alvo na técnica

espécie-específica possui apenas uma ocorrência, no cromossomo II da *B. ovis*.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade do método específico, foi então determinado o uso de um par de *primers* internos para realização da nested PCR a partir do produto obtido pela PCR espécie-específica. Manterola et al. (2003) referem que o uso da nested PCR em diagnóstico bacteriológico aumenta o risco de contaminação do DNA e resulta frequentemente em falso-negativos. Neste estudo, todas as amostras inseridas na reação como controles negativos não foram contaminadas, o que permite inferir que este método pode ser admitido como técnica para uso laboratorial, desde que exista local apropriado e restrito à execução apenas da nested PCR, e que haja preocupação quanto à possível contaminação entre as amostras já amplificadas que são processadas.

Em amostras de sêmen, a nested PCR obteve percentual de 53,93% de positividade, valor estatisticamente diferente ($P < 0,001$) dos obtidos pelas técnicas gênero e espécie-específicas da PCR. A concordância entre este método e os demais foi considerada razoável, pois o índice kappa obtido para a comparação entre a nested PCR e a PCR gênero-específica foi 0,2856 e o para a nested PCR e PCR espécie-específica foi 0,2653. Esta concordância classificada como razoável entre os exames, quando comparados à nested PCR, deve-se ao fato de que esta última técnica diagnóstica foi responsável por detectar positivas 33,51% (64/191) e 38,74% (74/191) das mesmas amostras que haviam sido negativas, respectivamente, quando analisadas pela PCR gênero-específica e pela PCR espécie-específica.

Em amostras de urina, a positividade obtida pela nested PCR foi de 49,97% (105/214), diferente significativamente ($P < 0,001$), quando comparada às obtidas pelas outras duas técnicas biomoleculares. A concordância foi também considerada pobre, tanto quando houve comparação entre a nested e a PCR gênero-específica, com índice kappa de 0,1557, quanto para comparação entre a nested PCR e a técnica espécie-específica, com 0,1451. A razão para esta discrepância entre os resultados é baseada na mesma justificativa mencionada para amostras de sêmen, uma vez que a nested PCR aumentou em 49,53 e 50,93% a frequência de resultados positivos em amostras anteriormente negativas nas reações gênero e espécie-específicas,

respectivamente. Os resultados obtidos concordam com os observados em estudos anteriores, em que a nested PCR apresentou sensibilidade maior quando comparada a técnicas de PCR simples (FEKETE et al., 1992; BAILY et al., 1992; HERMAN E DE RIDDER, 1992; ROMERO et al., 1995, DA COSTA et al., 1996).

Este estudo permitiu observar que a PCR espécie-específica possui menor sensibilidade frente à PCR gênero-específica, não a recomendando, portanto, como técnica diagnóstica de triagem. Porém a implementação da nested PCR demonstrou aumento da positividade extremamente significativo, associado a especificidade, sem evidências de contaminação em controles negativos durante a execução em laboratório, o que possibilita seu emprego no diagnóstico de rotina desta enfermidade, em amostras colhidas no campo, sêmen e de urina.

7. CONCLUSÕES

- A PCR gênero-específica apresentou maior percentual de positividade quando comparada à técnica espécie-específica em amostras de sêmen analisadas.

- A nested PCR espécie-específica demonstrou maior percentual de amostras positivas comparativamente à PCR gênero e espécie-específica, constituído-se como técnica diagnóstica mais sensível para detecção de *Brucella ovis* em amostras de sêmen e urina de ovinos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Paris: INRA, 1988. 190 p.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L.; et al. Ocorrência de Anticorpos Anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte. **Agropecuária Técnica**, v.25, n.2, p.45-50, 2004.
- BAIGÚN, R.; CONIGLIATO, A.S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serologicos em epididimitis ovina. **Veterinaria Argentina**, v.17, n.162, p.102-107, 2000.
- BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.95, p.271-275, 1992.
- BIBERSTEIN, E.L.; MCGOWAN, B.; OLANDER, H.; et al. Epididymitis in ram. Studies in pathogenesis. **Cornell Veterinarian**, v.54, n.1, p.27-41, 1964.
- BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.351-378.
- BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, v.14, p.381-382, 1987.
- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.435-446, 2002.
- BRICKER, B.J. Molecular Diagnostic of Animal Brucellosis: A Review of PCR-Based Assays on Approaches. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I (Eds). **Brucella: Molecular and Cellular Biology**. Pamplona: Horizon Bioscience, 2004, p.25-51.
- BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv.1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2660-2666, 1994.
- BROWN, G.M.; RANGER, C.R.; KELLEY, D.J. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. **Cornell Veterinarian**, v.61, p.265-280, 1971.
- BUCKRELL, B.C. Management of Reproduction of sheep. **The Canadian Veterinary Journal**, v.28, p.374-377, 1987.

- BUDDLE, M.B.; BOYES, B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v.29, p.145-153, 1953.
- BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative clinically normal breeding rams. **J. Am. Vet. Med.Assoc.**, v.196,n.2, p.313-315, 1990.
- BULGIN, M.S. Epididymitis in rams and lambs. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.6, p.683-690, 1990.
- BULGIN, M.S.; ANDERSON, B.C. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididimitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.182, p.372-374, 1983.
- BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. **Veterinary Microbiology.**, v.7, p.551-575, 1982.
- BURGESS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.62, n.8, p.262-264, 1985.
- CAMERON, R.D.; LAUERMAN JR., L.H. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. **The Veterinary Record**, v.99, p.231-233, 1976.
- CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; et al. Inquérito soro-epidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.137-143, 2007.
- CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; et al. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes and Infection**, v.3, n.9, p. 729-738, 2001.
- COLETO, Z.F.; PINHEIRO JR, J.W.; MOTA, R.A. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do Estado de e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27,n.3, p.551-553, 2003.
- CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, S.M.; et. al.. Detection of *Brucella* DNA from aborted foetus by polimerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.79, n.7, p. 500-501, 2001.
- DA COSTA, M.; GUILLOU, J.P.; GARIN-BASTUJI, B.; et al. Specificity of six gene sequences for the detection of genus *Brucella* by DNA amplification. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.267-275, 1996.

- ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epidemitis Contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.31, n.1, p.5-17, 1999.
- ESTEIN, S.M.; BALDI, P.C., BOWDEN, R.A. Comparison of serological based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n.5, p.407-411, 2002.
- FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; et al. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* Strains by use of Polimerase Chain Reaction with Arbitrary Primers. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7778-7783, 1992.
- FENSTERBANK, R.; PARDON, P.; MARLY, J. Efficacy of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine against *Brucella ovis* infections in rams. **Annales de Recherches Vétérinaires.**, v.13, p.185-190, 1982.
- FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D.; et al. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.64, n.8, p.248-250, 1987.
- FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D. Pathology of reproductive tracts of Merino rams in north western Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.66, n.8, p.262-264, 1989.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S., GODFROID, J.; et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.2688-2693, 2007.
- GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; et al. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **The Veterinary Record**, v.142, p.512-514, 1998.
- GIL TURNES, C. Brucelose ovina. In: CORREA, R.F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 1998, p.161-169.
- GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. **The Veterinary Record**, v.144, p.555-558, 1999.
- HAMDY, M.E.; AMIM, A.S. Deteccion of *Brucella* Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. **The Veterinary Journal**, v.163, p.299-305, 2002.

- HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2099-2101, 1992.
- HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double gel diffusion test and enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v.41, p.111-115, 1993.
- HUGHES, K.L.; CLAXTON, D. *Brucella ovis* Infection. An Evaluation of Microbiological, Serological and Clinical Methods of Diagnosis in the Ram. **Australian Veterinary Journal**, v.44, p.41-47, 1968.
- JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E.S. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Veterinary Microbiology**, v.57, n.4, p.373-382.1997.
- JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **Compend. Contin. Educ. Vet.**, v.14, p.763-772, 1992.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VANCOCELLOS, S.A; et al. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology** v.67, n.7, p.1203-1210, 2007.
- KOTT, R.W.; HARVER, G.C; FIREHAMMER, B; et al. Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. **Theriogenology**, v.29, n.4,p.961-970, 1988.
- KUMAR, P.; SINGH, D.K.; BARBUDDHE, S.B. Seroprevalence of brucellosis among abattoir personnel of Delhi. **The Journal of Communicable Diseases**, v.29, n.2, p.131-137, 1997.
- MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.75-79, 1996.
- MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCÉS, A.; FICAPAL, A.; et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in sêmen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.65-72, 2003.
- MARCO, J.; GONZÁLEZ, L.; CUERVO, L.A.; et al. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. **The Veterinary Record**, v.135, p.254-256, 1994.
- MARÍN, C.M.; JIMENES DE BAGUES, M.P.; BLASCO, J.M.; et al. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. **The Veterinary Record**, v.125, n.20, p.504-508, 1989.

- MARINHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.45-48, 1996.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.209-227, 2002.
- MYERS, D.M.; SINIUK, A.A. Preliminary report on the development of a diffusion-agar method for diagnosis of ram epididimitis. **Applied Microbiology**, v.19, p.335-337, 1970.
- NILO, L. Diagnosis of ovine Brucellosis. **The Canadian Veterinary Journal**, v.25, n.2, p.118-119, 1984.
- NOZAKI, C.N. Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de métodos diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*. 2008. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.
- NOZAKI, C.N.; et al. Inquérito sorológico da brucelose ovina em animais de exposição. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, 29, 2002, Gramado. Anais...Gramado, 2002.
- O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk, and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.170-176, 2006.
- OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; WIDADA, J.S.; et al. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.3265-3273, 1993.
- PAOLICCHI, F.A. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesions genitais y respuesta immune antiespermática. **Rev. Med. Vet.**, v.82, n.2, p.86-88, 2001.
- PAOLICCHI, F.; TERZOLO, H.; MALENA, R.; et al. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v.23, p.155-159, 1991.
- 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.

- RAMOS, A.A; MIES FILHO, A.; SCHENCK, J.A.P.; et al. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.211-213, 1966.
- RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 48, p.57-59, 2000.
- RIDLER, A.L; WEST, D.M. Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. **New Zealand Veterinary Journal**, v.50, n.1, p.19-22, 2002.
- RIS, D.R.; TE PUNGA, W.A. An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies 1. Development of the test. **New Zealand Veterinary Journal**, v.11, p.94-97, 1963.
- ROBLES, C.A; LA TORRACA, A.; SANCHOLUZ, M.; et al. Brucelosis ovina en majadas merino de la provincia de Chubut, Argentina . **Veterinaria Argentina**, v.10, n.97, p.460-461, 1993.
- ROBLES, C.A. *Brucelosis de los carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27p.
- ROBLES, C.A.; UZAL, F.A., OLAECHEA, F.V.; et al. Epidemiological observations in a Corriedale flock affected by *Brucella ovis*. **Veterinary Research Communication**, v.22, n.7, p.435-443, 1998.
- ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; et al. Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.615-617, 1995.
- ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3735-3737, 1999.
- SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F. e MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.720.
- SAUNDERS, V.F.; REDDAKLIFF, L.A.; BERG, T.; et al. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. **Australian Veterinary Journal**, v.85, n.1, p.72-77, 2007.
- SCHÄFER, I.; VAZ, A.; RAMELLA, J.; et al.. 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.

- SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; et al. Isolation of *Brucella microti* from Soil. **Emerging. Infectious Diseases.**, v.14, n.8, p.1316-1317, 2008.
- SEARSON, J.E. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis *Brucella ovis* infection in rams. **Australian Veterinary Journal**, v.58, n.1, p.5-7, 1982.
- SERGEANT, E.S.G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. **New Zealand Veterinary Journal**, v.42, p.97-100, 1994.
- SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; et al. 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.51-54, 2003.
- SPENCER, T.L.; BURGESS, G.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.194-198, 1984.
- TAMAYO, R.; VALENTIN, H.; SCHOEBITZ, R. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.21, n.1, p.22-28, 1989.
- TORRES, E.D.N.; APARICIO, E.D.; QUEZADA, F.V.; et al. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* em sementales ovinos jóvenes. **Veterinaria México**, v.28, n.3, p.241-245, 1997.
- TSOLIS, R.M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome Degradation in *Brucella ovis*, Corresponds with Narrowing of its Host Range and Tissue Tropism. **PloS one**, v.4, n.5, p.1-9, 2009.
- VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; et al. Taxonomy of the genus *Brucella*. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie (Paris)**, v.138, p.235-238, 1987.
- VIGLIOCCO, A.M.; SILVA PAULO, P.S.; MESTRE, J.; et al. Development and validation of an indirect enzyme linked immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.357-368, 1997.
- XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. Development and evaluation of a specie-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**. [Epub ahead to print], doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.037..

WALKER, R.L.; LEA MASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N.; et al. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.188, p.393-396, 1986.

WEBB, R.F.; QUINN, C.A.; COCKRAM, F.A.; et al. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Australian Veterinary Journal**, v.56, p.172-175, 1980.

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

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

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

ARTIGO

Intenção de publicação: Revista Theriogenology.

Modelo para formatação:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525024/authorinstructions

Article Structure

Subdivision - Numbered Sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below each heading.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American

spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

1 **SPECIES-SPECIFIC NESTED PCR AS DIAGNOSTIC TOOL FOR**
2 **BRUCELLA OVIS INFECTION IN RAMS**

3

4 Luciana Fachini da Costa ¹, João Marcelo de Azevedo de Paula Antunes ¹.
5 Mariana Noyma Xavier ², Cristiane Nozaki ¹, Nair Silva Cavalcanti Lira ¹, Renato
6 de Lima Santos ², Jane Megid ^{1***}

7

8 ¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de
9 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de
10 Mesquita Filho. 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.

11 ² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária,
12 Universidade Federal de Minas Gerais. 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

13 * Corresponding author: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública,
14 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista
15 Júlio de Mesquita Filho. Distrito Rubião Júnior. 18618-000 Botucatu, SP, Brazil.
16 Phone: 55-14-3811-6270. Fax: 55-14-38152343. E mail: .jane@fmvz.unesp.br

17

18

19

SPECIES-SPECIFIC NESTED PCR AS DIAGNOSTIC TOOL FOR

20

BRUCELLA OVIS INFECTION IN RAMS

21

22 Diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams is routinely performed by clinical
23 examination, serology and bacteriology. Due to limitations presented by each
24 technique, the diagnosis is usually made by two or more techniques to obtain a
25 conclusive result and the Polymerase Chain Reaction (PCR) has been used as
26 a tool in diagnosis of the infection.. In this study, a species-specific nested PCR
27 was developed from amplified products of a species-specific PCR previous
28 described, and the percentage of positivity obtained by nested PCR was
29 compared to those obtained by a genus-specific PCR that amplifies the region
30 IS6501, in 191 semen and 214 urine samples from experimentally infected rams
31 with strain of *B. ovis* REO 198. The species-specific nested PCR showed higher
32 percentage of positivity ($P < 0.001$) when compared to genus-specific in semen
33 (53.93% and 24,08%, respectively) and urine (49.07% and 10,28%). Thus, the
34 implementation of the species-specific nested PCR showed highly significant
35 increase in positivity, associated with specificity, in samples of semen and urine
36 from experimentally infected rams.

37

38 Keywords: *Brucella ovis*, species specific nested PCR, genus-specific PCR,
39 semen, urine.

40

41

42 **1. Introduction**

43

44 Ovine brucellosis caused by *Brucella ovis* is a contagious disease, with
45 venereal and oral transmission, that causes reproductive disturbances in
46 rams.[11]. Ovine brucellosis does not occur only by *B. ovis*, which has no
47 zoonotic feature, but also by *B. melitensis* infection, which is the most
48 pathogenic *Brucella* species for humans [3], justifying why the differential
49 diagnosis of *B. ovis* is important in regions where these two species of *Brucella*
50 in rams are present [15].

51 Routine diagnostic tests of ovine brucellosis are clinical examination, serological
52 tests and bacteriology [1,6]. Due to limitations of these techniques , the
53 diagnosis of brucellosis in rams is usually based in association of two or more
54 techniques..

55 PCR has been used as a diagnostic tool, since it is highly sensitive,
56 specific, inexpensive, fast and simple to be performed [4]. This technique
57 demonstrated similar [8] or higher sensitivity than the presented by bacteriology
58 for *B. ovis* [10,15], and enables rapid identification of the pathogen in semen
59 10,13,15] and urine samples [10,15] collected from infected animals. Xavier et
60 al. [15] developed a species-specific PCR, based on the amplification of an
61 open reading frame (ORF) specific of chromosome II of *B. ovis*. However, this
62 selected ORF occurs only once in the gene of *B. ovis*, what can be responsible
63 for lower sensitivity when compared to another that has repeated target-
64 sequences preserved in all classical *Brucella* species. The aim of the present
65 study is to evaluate the positivity of the specific diagnosis of *B. ovis* by using
66 species-specific nested PCR comparatively to a genus PCR that amplifies
67 repetitive sequences present in the genome of *Brucella*, in semen and urine
68 from rams experimentally infected with *B. ovis*.

69

70 **2. Material and Methods**

71 Semen and urine samples of experimentally infected rams

72 In this study, 191 samples of semen and 214 of urine obtained from
73 serologically positive animals inoculated with strain *B. ovis* REO 198 were
74 processed

75 Extraction of *Brucella ovis* DNA

76 DNA extraction was performed with 500 µL of semen samples, 1000 µL of
77 thawed urine as previously described [9].

78 Amplification of *Brucella ovis* DNA by PCR

79 The present study used PCR with a primer pair targeting the sequence IS6501
80 (ISP1: 5'-GGTTGTTAAAGGAGAACAGC-3' and ISP2: 5'-
81 GGTTGTTAAAGGAGAACAGC-3'), presents in *Brucella* spp. (Manterola et al.,
82 2003). PCR reaction and cycle parameters were performed as previous
83 described [8] and a volume of 2,5 µL of template DNA were added per PCR
84 reaction. PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis.
85 Reactions were considered positives when they yielded products of 700bp.

86 Amplification of *Brucella ovis* DNA by nested PCR

87 The nested PCR amplified products obtained from species-specific PCR.
88 Species-specific PCR used a primer pair targeting ORfs AO503 (F: 5'-
89 GCCTACGCTGAAACTTGCTTTTG-3' and R: 5'-
90 ATCCCCCATCACCATACCGAAG-3'), a *B. ovis*-specific genomic island [14]
91 as previous described by Xavier et al.[15]. PCR reaction and cycle parameters
92 were performed [15] and a volume of 2,5 µL of template DNA were added per
93 reaction. Nested PCR used a primer pair targeting an internal sequence of
94 ORFs503 (F NO503: 5'-ATGGGATTTGCGATCCTGA-3' and R NO503: 5'-
95 CAACCACCCAAGTGTCAGTG-3'). PCR reactions were performed using 23 µL
96 of a commercial PCR mix (PCR Supermix, Invitrogen), 0.5 µL of a 25 µM
97 solution of each primer, 0.25 µL of Taq Polymerase (Invitrogen, Brazil), and 2,5
98 µL of template DNA. Cycling parameters were denaturation at 95°C for 5
99 minutes; 35 cycles of denaturation (95°C for 1 minute), annealing (55°C for 1
100 minute), and extension (72°C for 1 minute); and a final extension at 72°C for 5
101 minutes. PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and
102 reactions were considered positive when they yielded products of 171bp.

103

104 Statistical analysis

105 Proportion of results obtained from genera PCR and nested PCR was
106 compared and availed by McNemar statistical method.

107

108 **3. Results and Discussion**

109 With the objective of developing a species-specific PCR reaction with high
110 sensitivity species-specific nested PCR based in species-specific PCR method
111 for *B. ovis*, developed by Xavier et al. [15] was used. In this study a pair of
112 internal primers was delineated and a species-specific nested PCR evaluated
113 comparatively to genera PCR reported by Manterola [8] and routinely used.

114 In semen samples, positivity of nested PCR was 53.93% (103/191),
115 value statistically different ($P < 0.001$) from the genus PCR that presented
116 positivity of 24,08% (Figure 1). This result was similar to observed by Nozaki
117 [10], that obtained 21,6% of positives semen samples. The author utilized the
118 same primers pair selected in this study to amplify the sequence related to
119 genus *Brucella*. The results are higher than those reported by Xavier et al. [15],
120 who observed sensibility of 17,9% in semen of experimentally infected rams,
121 with a species-specific PCR using the same external primer pairs targeting a *B.*
122 *ovis*-specific genomic island that used in this work

123 In urine, 10,28% (22/214) of samples were positives by genus PCR
124 (Figure 2).. These results are in accordance with Nozaki [10] and Xavier et al.
125 [15], that demonstrated 12,7% and 19,7% of positives samples in genus and
126 species-specific PCR, respectively. Similarly to semen, when the urine samples
127 were submitted to species-specific nested PCR, after previous species-specific
128 PCR development, the percentage of positives was 49.97% (105/214), higher
129 that those obtained by Nozaki [10] and Xavier et al. [15] using a genus PCR and
130 a species-specific PCR , respectively ($P < 0.001$).

131 Manterola et al. [8] reported that use of nested PCR in bacteriological
132 diagnosis increases the risk of DNA contamination and often results in false

133 negatives. In this study, all samples included in the reaction as negative
134 controls were not contaminated, which suggests that this method can be
135 admitted as a technique for laboratory use, if processed in an appropriate local,
136 restricted only by use of nested PCR, and if there is concern regarding the
137 possible contamination between samples used in nested PCR, which are
138 already amplified by PCR previously. The results of this study are in concern
139 with reports in which nested PCR has been demonstrated as an assay for
140 increasing sensibility in the diagnosis of infections caused by *Brucella* spp.
141 [2,5,7,12].

142

143 **4. Conclusion**

144 In conclusion, the species-specific nested PCR developed in this study
145 demonstrated to be highly sensitive, as presented sensitivity higher than genus-
146 specific PCR, in samples of semen and urine from infected rams. Thus, the
147 nested PCR is a tool that can be implemented in routine diagnosis of *B. ovis*.

148

149 **5. Acknowledgements**

150 Work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado
151 de São Paulo, São Paulo, Brazil). Da Costa LF is recipient of fellowships from
152 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
153 Brasília, Brazil).

154

155 **6. References**

- 156 [1] Alton GG, Jones LM, Angus RD, et al. Techniques for the Brucellosis
157 Laboratory., Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) 1988; 66.
158 [2] Baily GG, Krahn JB, Drasar BS. et al. Detection of *Brucella melitensis* and
159 *Brucella abortus* by DNA amplification, The Journal of tropical medicine and
160 hygiene 1992; 95:271-275.
161 [3] Blasco JM. *Brucella ovis*. In: Nielsen K, Duncan JR. Animal Brucellosis. CRC
162 Press, 1990, pp.351-378.
163 [4] Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis, Veterinary microbiology
164 2002; 90:435-446.

- 165 [5] Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, et al. Specificity of six gene
166 sequences for the detection of genus *Brucella* by DNA amplification. Journal of
167 Applied Microbiology 1996; 81:267-275.
- 168 [6] Grilló MJ, et al. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. The
169 Veterinary Record 1999; 144:555-558.
- 170 [7] Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the
171 polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology 1992;
172 58:2099-2101.
- 173 [8] Manterola L, Tejero-Garces A, Ficapal A, et al. Evaluation of a PCR test for
174 the diagnosis of *Brucella ovis* infection in sêmen samples from rams. Veterinary
175 microbiology 2003; 92:65-72.
- 176 [9] Matrone M, Keid LB, Rocha VCM, et al. Evaluation of DNA extraction
177 protocols for *Brucella abortus* pcr detection in aborted fetuses or calves born
178 from cows experimentally infected with strain 2308. Brazilian Journal of
179 Microbiology 2009; 40:480-489.
- 180 [10] Nozaki CN. Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de métodos
181 diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos inoculados
182 experimentalmente com *Brucella ovis*. Tese (Doutorado). Faculdade de
183 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
184 Mesquita Filho” 2008, Botucatu.
- 185 [11] Robles CA. *Brucelosis em carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto
186 Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008; 27.
- 187 [12] Romero C, Gamazo C, Pardo M, et al. Specific detection of *Brucella* DNA
188 by PCR. Journal of clinical microbiology 1995; 33:615-617.
- 189 [13] Saunders VF, Reddacliff LA, Berg T, et al. Multiplex PCR for the detection
190 of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen.
191 Australian veterinary journal 2007; 85:72-77.
- 192 [14] Tsolis RM, Sechadri R, Santos RL. Genome degradation in *Brucella ovis*,
193 corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. Plos one 2009;
194 4:1-9.
- 195 [15]. Xavier MN, Silva TMA, Costa EA, et al. Development and evaluation of a
196 species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams.
197 Veterinary microbiology. In press.

Figure legends

Figure 1. Percentage of positivity detected by genus specific PCR and detected by species-specific nested in semen samples from rams experimentally infected with REO 198.

Figure 2. Percentage of positivity detected by genus specific PCR and detected by specie-specific nested in urine samples from rams experimentally infected with REO 198.

Figure 1

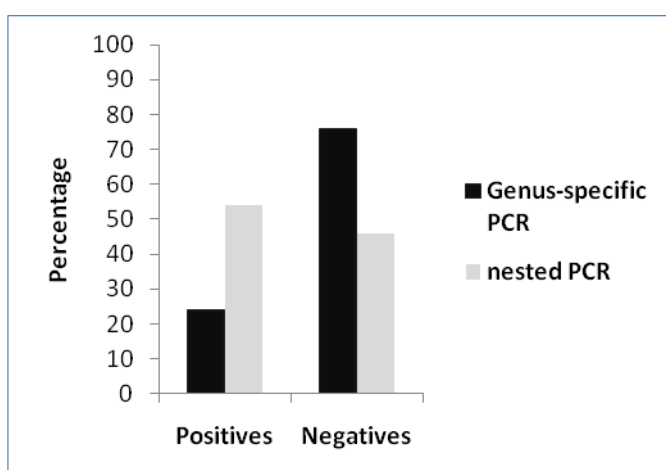
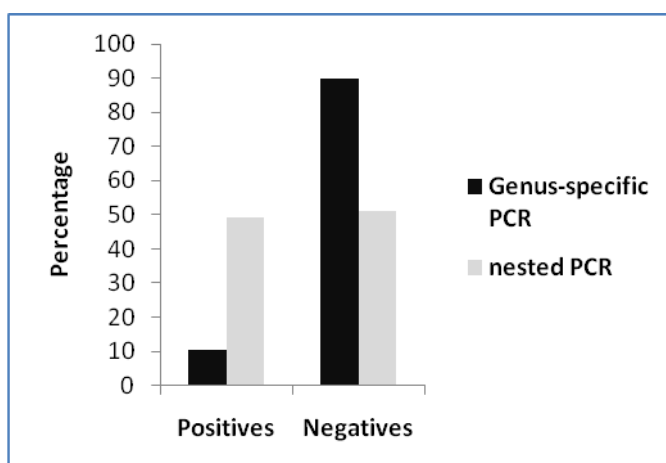


Figure 2



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)