

1. INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes como atividade de exploração comercial encontra-se amplamente difundida pelo mundo, principalmente nos países que possuem regiões de clima semi-árido (PAYNE & ELLIS, 1996). Em números, o rebanho ovino brasileiro está estimado em 16.019.170 cabeças, concentrando-se em principalmente na Região Nordeste com 9.379.380 (58,55%), seguida pelas Regiões Sul com 4.491.523 (28,04%), Centro-Oeste com 987.090 (6,16%), Sudeste com 664.422 (4,15%) e Norte com 496.755 (3,10%) (IBGE, 2008).

Mesmo sendo uma atividade com grande potencialidade de crescimento, o baixo desempenho zootécnico e econômico observado nas unidades de produção ovina, normalmente está relacionado a problemas sanitários, bem como a ausência ou uso inadequado de tecnologias. Neste contexto, destacam-se a ocorrência de doenças infecto-contagiosas que são responsáveis por elevadas perdas econômicas nos rebanhos nacionais (PINHEIRO JUNIOR et al., 2009). Além disto, atuam como fatores limitantes da produtividade do rebanho e comprometem a oferta de produtos como carne, leite e derivados (MACIEL 2006).

Diferentes discussões sobre outras vias de transmissão de agentes infecciosos foram recentemente levantadas, destacando-se a via horizontal através do sêmen contaminado, com significado epidemiológico para determinados agentes infecciosos. Testes de diagnóstico sensíveis e específicos são necessários para o controle e prevenção da disseminação de micro-organismos nos rebanhos, favorecendo a triagem de animais positivos e redução da ocorrência de surtos em um rebanho. A utilização do sêmen como amostra na identificação direta de agentes infecciosos, principalmente os patógenos sujeitos à transmissão venérea, possibilitado pelo advento dos métodos de detecção molecular, poderiam nortear as centrais de inseminação na aquisição e controle dos reprodutores utilizados, bem como, garantir a biosseguridade do sêmen comercializado (WENTINK et al., 2000).

Os métodos moleculares descartam a necessidade de cultivo microbiológico, garantindo uma detecção direta do patógeno na amostra clínica (GILBRIDE, 2006). A PCR Multiplex, técnica variante da PCR convencional é apontada como ferramenta que incrementa o diagnóstico na rotina laboratorial (YANG & ROTHMAN, 2004), com diminuição no tempo de processamento e finalização do diagnóstico microbiológico (SETTANNI & CORSETTI, 2007). Desde sua descrição, em 1988, tem sido utilizada em diferentes áreas, incluindo análises de deleções gênicas, mutações e polimorfismos, além

de análises quantitativas (TANG et al., 1997). No campo das doenças infecciosas é uma ferramenta importante na identificação de vírus, bactérias e outros parasitas de forma simultânea (SONG, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Padronizar uma PCR Multiplex para detecção de *Brucella* sp., *Brucella ovis*, *Leptospira* sp., *Actinobacillus seminis*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* para o diagnóstico simultâneo destes patógenos em amostras de sêmen ovino.

2.2. Específico

Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR Multiplex em relação a PCR convencional para detecção em concentrações decrescentes destes agentes quando combinados na mesma reação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Uso da inseminação artificial em pequenos ruminantes

O emprego de biotécnicas aplicadas à reprodução de animais de produção possibilitou de forma evidente a seleção de animais de alto valor genético, portadores das principais características produtivas desejadas, podendo ser repassadas para a sua progênie. Nesse contexto, a utilização da inseminação artificial (IA) se sobressai como veículo para obtenção de tal melhoria genética, graças aos avanços rápidos em tecnologias aplicadas na utilização de sêmen, se mostrando um método eficaz e econômico, sendo a técnica mais bem aceita pela maioria dos criadores (THIBIER & GUERIN, 2000; VISHWANATH et al., 2003).

Em pequenos ruminantes, o processo de inseminação artificial emprega mais comumente o sêmen fresco, utilizando técnicas de deposição do sêmen no lúmen vaginal (deposição pericervical) ou na cérvix (deposição intracervical), resultando em aceitáveis taxas de prenhez. Para a utilização de sêmen congelado, esses mesmos resultados aceitáveis de gestação só são conseguidos com o uso de laparoscopia ou inseminação intrauterina transcervical, uma vez que a criopreservação induz a um decréscimo na viabilidade e motilidade dos espermatozoides (THIBIER & GUERIN, 2000; CSEH et al., 2012).

A busca por diluentes livres de aditivos animais tem se tornado alvo de interesse nos estudos químicos para obtenção de melhorias no sêmen, buscando a biossegurança e padronização no processamento laboratorial do sêmen comercializado (CSEH et al., 2012).

A composição fisiológica do sêmen baseia-se em espermatozoides, fluido seminal, células germinativas imaturas e células não-espermáticas (epiteliais e células leucocitárias), sendo cada componente um potencial veículo na transmissão de agentes patogênicos (BIELANSKI et al., 2007). A transmissão de agentes infecciosos pelo sêmen é um risco que deve ser evitado, uma vez que o sêmen comercializado deve ser livre de qualquer agente patogênico. Diferentes agentes patogênicos e não-patogênicos (oportunistas) já foram detectados no sêmen, com variações em seu risco de transmissão (WENTINK et al., 2000).

A inseminação artificial é uma conhecida ferramenta na profilaxia de doenças venéreas, contudo alguns micro-organismos podem estar presentes no sêmen quando associados às células sanguíneas (infecções sistêmicas) ou inflamações das glândulas sexuais acessórias. Além disso, a contaminação do sêmen também pode ocorrer pela

intensa contaminação de micro-organismos presentes na urina ou na cavidade prepucial, associada também às irregularidades durante a coleta e processamento da amostra (SANOCKA et al., 2004; BIELANSKI et al., 2007).

A criopreservação garante vantagens no armazenamento do sêmen, bem como facilita seu transporte e revenda, mas não elimina o risco da transmissão de certos agentes infecciosos (CSEH et al., 2012), onde o sêmen passa a ser um veículo de disseminação (JUNQUEIRA JUNIOR et al., 2012).

O Brasil apresenta uma relação de perigos de importação para o sêmen de pequenos ruminantes, e mesmo para alguns microrganismos, considerados enzoóticos no território nacional, é feito controle oficial, sujeito à avaliação de risco para comercialização de material genético (CBRA, 1998; BRASIL, 2004; OIE, 2006). As principais doenças de notificação obrigatória listadas pela OIE para pequenos ruminantes, com risco potencial de transmissão venérea foram sumarizadas na Tabela 1 e Tabela 2, adaptadas de CSEH et al. (2012).

O Código Zoosanitário dos Animais Terrestres da OIE (OIE, 2006), é amplamente utilizado como padrão governamental para fiscalização e emissão de certificações para comercialização de sêmen (bovino, equino, ovino, caprino e suíno), com a finalidade de diminuir eventuais riscos na transmissão de doenças de notificação obrigatória. Em resumo, as recomendações mais abordadas baseiam-se no controle e monitoramento individual dos reprodutores antes de sua entrada nas centrais de IA, e que estes sejam periodicamente avaliados e testados através de exames clínicos, espermogramas e outros testes padrões adotados para cada tipo de doença, em sua maioria, baseados em exames sorológicos (THIBIER & GUERIN, 2000; OIE, 2006).

Tabela 1: Doenças que afetam outras espécies com possível transmissão via inseminação artificial (Lista B – OIE)

Doenças que afetam outras espécies	Status de transmissão via sêmen
Língua Azul	P, Tr
Doença das Fronteiras	P, (Tr)
Plueropneumonia Bovina (<i>Mycoplasma mycoides</i>)	(P), (Tr)
Brucelose (<i>Brucella melitensis</i>)	P, (Tr)
Febre Aftosa	P, Tr
Encefalite Japonesa	(P), (Tr)
Leptospirose	P, Tr
Paratuberculose	P, (Tr)
Febre Q	P, (Tr)
Rinderpest	P, (Tr)

Fonte: Adaptada de Cseh et al. (2012).

Legenda: P, presença do agente no sêmen; Tr, transmissão demonstrada via sêmen; (P), presença no sêmen não evidente, porém com grande probabilidade; (Tr), transmissão ainda não demonstrada, mas com grande probabilidade;

Tabela 2: Doenças específicas para ovinos e caprinos com possível transmissão via inseminação artificial (Lista B – OIE)

Doenças específicas para ovinos e caprinos	Status de transmissão via sêmen
Pleuropneumonia Contagiosa Caprina	(P), (Tr)
Aborto Enzoótico Ovino (<i>Chlamydophila</i> sp.)	P, (Tr)
Lentivirose	P, (Tr)
Epididimite Ovina (<i>Brucella ovis</i>)	P, (Tr)
Peste dos Pequenos Ruminantes	P, (Tr)
<i>Salmonella</i> sorotipo <i>Abortus-ovis</i>	P, (Tr)
Scrapie	*
Varíola Ovina e Caprina	P, (Tr)

Fonte: Adaptada de Cseh et al. (2012).

Legenda: P, presença do agente no sêmen; Tr, transmissão demonstrada via sêmen; (P), presença no sêmen não evidente, porém com grande probabilidade; (Tr), transmissão ainda não demonstrada, mas com grande probabilidade;

*, não detectada no sêmen, mas genótipo do animal portador deve ser considerado como capaz para transmissão.

3.2. Agentes infecciosos de importância reprodutiva para pequenos ruminantes

3.2.1. *Brucella* spp.

As α -proteobactérias incluídas no gênero *Brucella* são coco-bacilos Gram-negativos, imóveis, intracelulares facultativos e podem infectar diferentes espécies de animais, bem como o homem (MELTZER et al., 2006). Seis espécies clássicas compõe o

gênero: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Brucella canis* e *Brucella neotomae* (GODFROID et al., 2010). Recentemente, quatro novas espécies foram descritas: *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos, podendo ocasionar doenças em humanos (SOHN et al., 2003); *Brucella microti*, isolada de ratazana (*Microtus arvalis*) e raposas (*Vulpes vulpes*) (SHOLZ et al., 2008) e *Brucella inopinata* isolada de um implante de seio humano (DE et al., 2008; SCHOLZ et al., 2010).

A classificação de tais espécies e seus diferentes sorovares tem como base as diferenças na patogenicidade e preferências por hospedeiros, podendo ser avaliadas utilizando testes baseados na caracterização fenotípica para presença de antígenos para o lipopolissacarídeo (LPS), tipo de fago, sensibilidade para requerimento de CO₂, produção de H₂S e outras propriedades metabólicas (GODFROID et al., 2010).

A Brucelose é uma zoonose e a infecção pode ser atribuída a cinco das seis espécies clássicas encontradas nos mamíferos terrestres (*Brucella ovis* não é incluída como zoonose). Diferentes estudos apontam que o controle da brucelose animal resulta em um substancial declínio da doença em humanos (PAPPAS et al., 2006).

As principais espécies patogênicas, amplamente distribuídas ao redor do mundo são: *Brucella abortus*, responsável pela brucelose bovina; *Brucella melitensis*, agente etiológico da brucelose caprina e ovina; *Brucella suis*, responsável pela brucelose suína; estas espécies causadoras de abortos são alvo de controle pelas diferentes organizações veterinárias internacionais, onde após a detecção de um surto em um determinado rebanho, são impostas restrições de movimento e comercialização de animais (GODFROID et al., 2010). *Brucella ovis* é apontada como principal agente causador de epididimite em carneiros e *Brucella canis* como agente causador de infertilidade em caninos.

Infecções por *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*, com suas distintas cepas são relatadas em outras espécies de animais domésticos e selvagens que atuam como hospedeiros acidentais (KANG et al., 2011).

O principal sinal clínico observado em casos de brucelose é o aborto na primeira gestação. Usualmente, as fêmeas abortam apenas uma única vez, porém manterão a infecção ao longo da vida, podendo resultar em outras síndromes clínicas e constante disseminação do agente no rebanho (GODFROID et al., 2010). Os machos são mais resistentes à infecção, e quando acometidos, a infecção limita-se ao sistema reprodutor (BURGESS, 1982).

A superfície da mucosa do trato digestivo é a principal via de penetração da *Brucella abortus* e *Brucella melitensis*, diferentemente das *Brucella ovis*, *Brucella suis* e *Brucella canis* que penetram através da mucosa do trato genital (OLSEN et al., 2004); as mucosas das vias conjuntivas e intranasais também são passíveis de penetração do agente (PLANT et al., 1986).

In vivo, as brucelas se difundem rapidamente através das camadas celulares e são fagocitadas por macrófagos. Cepas virulentas possuem a habilidade de sobreviver e multiplicar dentro de células fagocitárias por longos períodos, favorecendo sua posterior disseminação no organismo e causar a reemergência da doença (ROOP II et al., 2004). A interação entre as células epiteliais e *Brucella* é fundamental para o desenvolvimento da infecção, porém os mecanismos moleculares e fatores empregados na adesão e migração por essa bactéria através do epitélio ainda são escassos. Até o momento, poucos genes bacterianos envolvidos nos mecanismos de adesão, invasão e sobrevivência à fagocitose foram identificados; são apontados como destaque, dois componentes do sistema regulatório: BvrR/BvrS que são genes críticos no processo de regulação estrutural da membrana bacteriana (ROSSETTI et al., 2011).

A infecção por *Brucella*, principalmente em bovinos via sêmen contaminado durante a inseminação artificial é apontada como rota mais frequente de transmissão desta bactéria quando comparada à monta natural, uma vez que o sêmen pode ser depositado diretamente no útero, órgão pobre em células de defesa (BRASIL, 2004).

O isolamento bacteriano ainda é descrito como método padrão para o diagnóstico definitivo da doença, porém apresenta sensibilidade limitada, sendo um método laborioso e de custo elevado. Métodos indiretos de identificação, principalmente os testes sorológicos são empregados com maior sucesso no diagnóstico e controle da doença nos rebanhos. Os principais métodos sorológicos empregados são o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Fixação de Complemento (FC) e Soro-aglutinação (SAT), que determinam o estágio de infecção do hospedeiro (O'LEARY et al., 2006) e os animais soro-reagentes devem ser sacrificados como medida de controle da doença (BRASIL, 2004).

3.2.2. Epididimite Infecciosa Ovina

A Epididimite Infecciosa Ovina é definida como uma doença infectocontagiosa, caracterizada por alterações inflamatórias uni ou bilateral, envolvendo principalmente o epidídimo dos reprodutores ovinos (BURGESS, 1982; GOMES et al., 2001; MOUSTACAS et al., 2013). É considerada como a principal causa de subfertilidade e

infertilidade em carneiros, levando a grandes perdas econômicas aos proprietários, uma vez que reduz a vida reprodutiva do macho, com diminuição nas taxas de cobertura e parição das ovelhas (AFZAL et al., 1986).

Diferentes micro-organismos já foram isolados de casos de epididimite, porém a maioria dos casos é de origem bacteriana e associada à presença de *Brucella ovis*, seguida por *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* (BURGESS, 1982; HAJTÓS et al., 1987; CARVALHO JUNIOR et al., 2010); outros agentes como *Salmonella enterica* sorotipo Diarizonae (FERRERAS et al., 2007), *Arcanobacterium pyogenes* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* também já foram isoladas de casos de epididimite ovina (JANSEN, 2007).

Agentes virais como Maedi-visna, Herpesvírus Ovino Tipo 2 e o vírus da Língua Azul também podem estar presentes nos órgãos reprodutivos de carneiros, porém somente este último já foi relacionado à doença reprodutiva com queda na fertilidade de reprodutores desta espécie (MENDONÇA et al., 2008; KIRSCHVINK et al., 2009).

A prevalência da epididimite ovina pode variar diretamente com a suscetibilidade da raça (BURGESS, 1982). Em diferentes estudos sorológicos em animais de raças de origem britânica com lesões clínicas, foram relatadas prevalências de 30-45% de infecção por *Brucella ovis*, seguidas por prevalências inferiores nas raças Merino (2,1%), Dorper (5,7%) e Karakul (3%) (HAJDU et al., 1968; VAN TONDER et al., 1979).

Evidências sorológicas e bacteriológicas demonstraram a infecção por *Brucella ovis* em 79,5% dos carneiros adultos com lesões no epidídimo. *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* são bactérias mais frequentemente isoladas de carneiros jovens com lesões no epidídimo (WALKER et al., 1986), sendo considerados patógenos oportunistas, presentes nas mucosas do trato reprodutor (NÁREZ et al., 1999), onde além de desordens reprodutivas, podem estar associados a outras manifestações clínicas, como pneumonia, meningoencefalite, septicemia, orquite e peri-orquite purulentas (MOUSTACAS et al., 2013). *Histophilus somni* também está associado a casos de mastite e placentite em matrizes e sinovite em cordeiros (BURGESS, 1982).

A realização de exame clínico da genitália externa de carneiros, com ênfase para a palpação escrotal, é considerada uma técnica válida para o diagnóstico de epididimite em ovinos (PUENTE-REDONDO, et al. 2000). O exame é capaz de detectar alterações macroscópicas que afetam a fertilidade. Além disto, possui baixo custo e o diagnóstico clínico pode ser informado imediatamente ao proprietário (WEBB et al., 1980), porém não é capaz de identificar com exatidão o agente envolvido e suas características

microbiológicas. Portanto, o isolamento do agente, principalmente utilizando o sêmen como amostra é considerado o diagnóstico definitivo para a doença (BURGESS, 1982). Testes sorológicos baseados na presença de anticorpos no soro para os diferentes agentes envolvidos nesta enfermidade servem como ferramenta auxiliar no diagnóstico, porém devem ser realizados com cautela, com a exata escolha no tipo de teste empregado, estando sua sensibilidade e especificidade diretamente relacionadas ao modo de extração do antígeno utilizado (SANTOS et al., 2005).

3.2.3. *Brucella ovis*

Brucella ovis é um coco-bacilo Gram-negativo com tamanho aproximado de 0,5-0,7 por 0,6-1,5µm, usualmente de arranjo individual ou raramente formando cadeias curtas; não possui cápsula e é imóvel. Seu crescimento ótimo ocorre em culturas incubadas em atmosfera de 10% de CO₂ a 37°C, podendo ser cultivada em meios sólidos enriquecidos com soro ou sangue desfibrinado bovino, ovino ou equino e não produzem hemólise. Possuem crescimento lento e após 5-7 dias de incubação formam colônias de 2mm de diâmetro, de morfologia circular, convexa, coloração acinzentada e superfície brilhante (BURGESS, 1982).

Diferente de outras espécies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*) que apresentam aspecto de colônias lisas, *Brucella ovis* e *Brucella canis* apresentam aspecto rugoso, explicado pela ausência da cadeia O no lipopolissacarídeo (LPS) que resulta na formação incompleta da parede celular (ALTON et al., 1988; SLEEM et al., 2008).

A infecção por *Brucella ovis* tem distribuição cosmopolita e está presente em todas as áreas onde a ovinocultura possui importância econômica com exceção da Grã-Bretanha (BURGESS, 1982). É considerado o agente mais importante como causador de infertilidade no macho, estando amplamente relacionado a significativos impactos econômicos na cadeia produtiva ovina (GOMES et al., 2001).

As primeiras evidências do agente foram descritas por McFarlane et al. em 1952, com o isolamento de um coco-bacilo em surtos de abortos em ovelhas na Nova Zelândia. Subsequentemente, os mesmos pesquisadores concluíram o envolvimento desta mesma bactéria em casos de epididimite em carneiros. Em 1953, Buddle & Boyes caracterizaram o isolado neozelandês como pertencente ao gênero *Brucella* e, três anos depois, o organismo foi denominado *Brucella ovis*. Outros países também descreveram o isolamento desta bactéria; na Austrália em 1953 por Simmons & Hall; Estados Unidos em 1956 por McGowan & Schultz e África do Sul em 1958 por Van Rensburg

(BURGESS, 1982). No Brasil, *Brucella ovis* foi diagnosticada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1966).

Levantamentos sorológicos em diferentes regiões do mundo demonstraram que a prevalência da doença em rebanhos varia entre 9,1 e 46,7% (SERGEANT, 1994) e a prevalência em carneiros em um rebanho infectado pode variar entre 2,1 e 67% (SERGEANT, 1994; TORRES et al., 1997; ROBLES et al., 1998). No Brasil, estudos realizados no estado do Rio Grande do Sul apontaram prevalência média de 13,4% (com variação de 6,9 a 50%) de carneiros infectados em rebanhos positivos (CARDOSO et al., 1989; MAGALHÃES NETO & GIL-TURNES, 1996). Em Minas Gerais foi demonstrada soroprevalência de 5,3% de ovinos infectados por *Brucella ovis* e o percentual de propriedades positivas foi de 29,4% (MARQUES, 2006).

Evidências sorológicas da infecção por esta bactéria também foram descritas na Região Nordeste do Brasil. Na Paraíba, 8,6% das propriedades analisadas foram positivas com prevalência de 5,6% de reprodutores soro-reagentes (CLEMENTINO et al., 2007). Em Pernambuco, Coletto et al. (2003) encontraram 16,25% (26/160) de animais soro-reagentes no teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), confirmando a presença de *Brucella ovis* e sua participação em síndromes reprodutivas em fêmeas. Em Alagoas, Pinheiro Junior et al. (2009), utilizando 579 amostras, distribuídas em dez propriedades, encontraram 3,1% de positividade e observaram diferenças significativas nas variáveis: região, sistema de criação e histórico reprodutivo do rebanho.

A infecção natural por *Brucella ovis* é praticamente exclusiva de ovinos domésticos (SANTOS et al., 2005), podendo ainda ser observada em cervídeos (*Cervus elaphus*, *Odocoileus virginianus*) (RIDLER & WEST, 2002) e carneiros selvagens (*Ovis musimon*) na Sardenha e Córsega (CERRI et al., 2002). Os carneiros selvagens aparentemente são resistentes à doença; em cervídeos, o quadro clínico é semelhante ao descrito em ovinos domésticos (RIDLER et al., 2002), sendo apontada a capacidade de transmissão do agente por ovinos domésticos para os cervídeos quando ambas as espécies são mantidas no mesmo ambiente (RIDLER et al., 2002).

De acordo com Burgess (1982), os caprinos também podem ser experimentalmente infectados por *Brucella ovis* e são capazes de eliminar o agente no sêmen, sendo um fator epidemiológico importante, quando considerada a criação desta espécie em contato direto com ovinos.

A presença desta bactéria no sêmen de animais infectados é considerada a principal via de transmissão da bactéria e carneiros persistentemente infectados podem

excretar o agente no sêmen por um período que pode variar entre 2 a 4 anos. Acredita-se que a transmissão natural de *Brucella ovis* ocorra primariamente por via venérea, através do contato entre as mucosas (CERRI et al., 2002). A fêmea apresenta grande importância na transmissão do agente, quando esta, no mesmo período de estro copula com um macho infectado e logo depois com outro carneiro suscetível (PAOLICCHI et al., 2000). O comportamento homossexual, exacerbado na espécie ovina, também é apontado como fator na transmissão do agente no rebanho (BURGESS, 1982). Carneiros sexualmente maduros são mais suscetíveis à infecção do que machos jovens, porém esta pode ocorrer em carneiros com até quatro meses de idade (WALKER et al., 1986).

Diversos estudos demonstraram que animais sem alterações clínicas evidentes são capazes de eliminar *Brucella ovis* no sêmen (BIBERSTEIN et al., 1964; PLANT et al., 1986). Experimentalmente foi comprovada a infecção utilizando sêmen de carneiros com diferentes concentrações microbianas viáveis por diferentes vias de inoculação: intraprepucial (BUDDLE & BOYES, 1953; WEBB et al., 1980); intraconjuntival (BIBERSTEIN et al., 1964) e intranasal (BURGESS, 1982), obtendo evidências sorológicas, bacteriológicas e clínicas da doença com variações entre 68-100% dos animais. Estudos com fêmeas em infecções experimentais, utilizando as vias intravenosa intraconjuntival e intravaginal resultaram em morte fetal esporádica e ocorrência de natimortos, bem como nascimento de cordeiros fracos (MCFARLANE et al., 1952; BUDDLE & BOYES, 1953).

Em ovinos, *Brucella ovis* causa infecções clínicas e subclínicas caracterizadas por epididimite uni ou bilateral, orquite (secundária a epididimite) e infertilidade no macho, onde as lesões estão concentradas principalmente na cauda do epidídimo (SEARSON, 1994), ampola do ducto deferente e glândula vesicular (FOSTER et al., 1987). A infecção resulta em edema perivascular e infiltração linfocitária, seguida por hiperplasia, fibrose e obstrução do ducto epididimário, resultando em retenção do conteúdo, podendo ser observada também a metaplasia do epitélio epididimário (CARVALHO JUNIOR et al., 2010), bem como a formação de granuloma espermático (SANTOS et al., 2005), em consequência da estase espermática e subsequente extravasamento de esperma para o interstício (BURGESS, 1982). Este extravasamento pode desencadear uma reação imune anti-espermática com possíveis implicações na patogênese da infertilidade associada à infecção por *Brucella ovis* (PAOLICCHI et al., 2000).

A presença de orquite normalmente é secundária às lesões do epidídimo, sendo mais comumente observada a atrofia testicular (CERRI et al., 2002). Biberstein et al.

(1963) observaram a presença de *Brucella ovis* na glândula vesicular sem presença de lesões epididimárias, sugerindo tropismo da bactéria por este órgão.

Carneiros com lesões bilaterais nos testículos apresentam sêmen de pior qualidade quando comparados a animais com lesões unilaterais (BAGLEY et al., 1985). Frequentemente observa-se baixa qualidade do sêmen de carneiros infectados, mesmo quando as lesões teciduais não estão presentes, variando entre aspermia, com grande quantidade de células inflamatórias no ejaculado, principalmente neutrófilos, redução da motilidade e na concentração espermática, assim como anormalidades espermáticas secundárias (defeitos de cauda, presença de gota citoplasmática e mudanças no acrossoma) e primárias (anomalias de cabeça e tamanho) (BURGESS, 1982 *apud* CAMERON et al., 1971).

Em fêmeas, a principal alteração clínica descrita é o aborto e nascimento de cordeiros fracos (BURGESS, 1982). Em infecções experimentais, observou-se a ocorrência de abortos em torno de 30 dias após o início da gestação (OSBURN & KENNEDY, 1966).

O diagnóstico da epididimite causada por *Brucella ovis* deve ser realizado por meio do exame clínico-andrológico associado a coletas sucessivas de amostras de sêmen, onde os animais suspeitos devem ser submetidos concomitantemente a testes sorológicos e pesquisa direta do agente no sêmen (BRASIL, 2004).

Diversos métodos sorológicos podem ser utilizados para detectar anticorpos contra *Brucella ovis*. Dentre as provas mais utilizadas, destacam-se a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) (MYERS & SINIUK, 1970), ELISA indireto (GALL et al., 2003; ROBLES, 2008) e Fixação do Complemento (FC) (ALTON, 1988), sendo este último adotado como teste sorológico padrão.

O isolamento bacteriano no sêmen é considerado o teste diagnóstico definitivo (BURGESS, 1982), devendo ser feito utilizando coletas sucessivas no mesmo reprodutor, uma vez que a eliminação de *Brucella ovis* no sêmen é observada de forma intermitente (WEBB et al., 1980; RIDLER & WEST, 2002).

Por ser uma das enfermidades abordadas no Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO), as medidas de controle incluem: (I) a aquisição de animais comprovadamente negativos, oriundos de rebanhos negativos; (II) testes sorológicos semestrais em uma porcentagem significativa do rebanho, incluindo-se todos os reprodutores; (III) eliminação de ovinos reagentes/infectados; e (IV) combinação de exames clínicos e testes sorológicos, antes e depois da estação de monta ou na época da

reprodução (BRASIL, 2004). Cabe salientar que o foco principal do controle para *Brucella ovis* é o carneiro, portanto, a separação dos animais velhos dos jovens é de fundamental importância na eliminação do agente dos rebanhos (MARQUES, 2006).

No Brasil, os protocolos vacinais ainda são inviáveis, diferente de outros países que apresentam alta prevalência da doença, pois a vacina utilizada consiste de cepas atenuadas para *Brucella melitensis* e o Brasil possui *status* livre para esta espécie de *Brucella* (SANTOS et al., 2005; MARQUES, 2006).

3.2.4. *Actinobacillus seminis*

O gênero *Actinobacillus* inclui 22 espécies, onde 19 são isoladas de animais, porém apenas seis espécies estão associadas a doenças como: *A. lignieresii*, *A. suis*, *A. equuli*, *A. seminis*, *A. pleuropneumoniae* e *A. capsulatus* (RYCROFT & GARSIDE, 2000). Semelhante a outros membros do gênero *Pasteurellaceae*, as bactérias do gênero *Actinobacillus* estão presentes nas membranas mucosas do trato respiratório e reprodutor (CHRISTENSEN & BISGAARD, 2004).

Actinobacillus seminis é um coco-bacilo Gram-negativo pleomórfico, de crescimento lento, fastidioso, fraco fermentador, com crescimento ótimo quando incubado a 37°C em atmosfera com 10% de CO₂. Apresenta reação positiva nos testes bioquímicos para nitrato, catalase, oxidase, ornitina descarboxilase e negativa para urease, indol, fosfatase e β-galactosidase (APPUHAMY et al., 1998).

Foi isolado inicialmente, na Austrália, em 1960, em amostras de sêmen ovino acometidos por epididimite (BAYNES & SIMMONS, 1960). Posteriormente, esta bactéria foi isolada e identificada nos Estados Unidos; na África do Sul (BURGESS, 1982 *apud* WORTHINGTON & BOSMAN, 1968); Nova Zelândia (GUMBRELL & SMITH, 1974); Hungria (HAJTÓS et al., 1987); Argentina (ROBLES et al., 1998) e Reino Unido (HEATH et al., 1991).

No Brasil, quatro relatos descreveram o isolamento de *Actinobacillus seminis* na espécie ovina. O primeiro foi feito em um reprodutor ovino da raça Texel (SCHREINER et al., 1992), seguido pelo isolamento da bactéria em cinco animais com sinais clínicos de epididimite por Gomes et al. (2001) no Estado do Rio Grande do Sul. Gregory et al. (2009) relataram o isolamento da bactéria em um ovino da raça Dorper no Estado de São Paulo e mais recentemente, Bezerra et al. (2012) relataram a ocorrência de epididimite necrosante, causada por *Actinobacillus seminis* em carneiros destinados ao abate no

Estado de Pernambuco, sendo o primeiro registro desta bactéria na Região Nordeste do Brasil.

A transmissão venérea assume papel principal na disseminação desta bactéria no rebanho (BURGESS, 1982). Hajtós et al. (1987) apontaram como fatores predisponentes para o desenvolvimento da infecção, o estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual e deficiências nutricionais, principalmente em carneiros jovens. Lesões traumáticas do epidídimo também são apontadas como hipótese para o aparecimento da doença, onde a liberação de histamina e o acúmulo de pequenas quantidades de fluídos ricos em proteínas favorecem a colonização bacteriana (GOMES et al., 2001).

Vários casos clínicos e subclínicos de epididimite e orquite foram descritos em carneiros naturalmente infectados por *A. seminis* (HAJTOS et al., 1987; SCHREINER et al., 1992; MBAI et al., 1996; GREGORY et al., 2009). Esta bactéria também já foi isolada em amostras de sêmen (BAYNES & SIMMONS, 1960; HAJTOS et al., 1987; HEATH et al., 1991; PUENTE-REDONDO, et al. 2000).

A infecção no sistema reprodutor é primária e clinicamente são observadas lesões testiculares uni ou bilaterais, com diminuição do volume testicular, aumento do volume na cauda do epidídimo, presença de dor e aumento da temperatura à palpação, podendo ocorrer ruptura do escroto com descarga de exsudato purulento (GOMES et al., 2001; PUENTE REDONDO et al., 2000; BEZERRA et al., 2012). Tais alterações poderão revelar no exame andrológico baixa concentração, motilidade e viabilidade espermática, além da presença de neutrófilos no sêmen. Outros achados clínicos associados à infecção nos órgãos sexuais anexos e ainda no sistema respiratório podem ser observados em carneiros jovens (CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

O efeito sobre a fertilidade do macho dependerá da intensidade das lesões, onde os casos mais graves podem resultar em esterilidade permanente (BURGESS, 1982). Em casos de infecções crônicas, como consequência do processo inflamatório no epidídimo, pode ser observada intensa fibrose intersticial, com oclusão dos ductos epididimários (TONDER et al., 1979).

Para diagnóstico da epididimite por *Actinobacillus seminis*, após a avaliação clínica e andrológica do animal, outros métodos laboratoriais complementares devem ser realizados (CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

Para isolamento microbiano podem ser utilizadas amostras de sêmen ou conteúdo purulento dos testículos colhido de forma asséptica. O sistema API-ZYM, baseado na

diferenciação enzimática e características bioquímicas é empregado como método prático para diferenciação entre bactérias que apresentam mínimas diferenças fermentativas e são isoladas das mesmas fontes como *Histophilus somni* (COUSINS & LLOYD, 1988). O teste-padrão sorológico para *Actinobacillus seminis* é a Fixação do Complemento, porém os métodos sorológicos não têm apresentado resultados satisfatórios (GOMES et al., 2001), uma vez que é necessário a utilização da combinação de variáveis tipos de cepas do agente (BURGESS, 1982).

O controle da doença pode ser feito pelo descarte de animais com sinais clínicos ou soropositivos para a presença do agente; nos reprodutores devem ser realizados exames periódicos, sorológicos e bacteriológicos, antes e após o período de monta (CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

3.2.4. *Leptospira* spp.

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae, filo Spirochaetales e compreende espécies saprófitas e patogênicas que infectam humanos e animais, causando a leptospirose (XUE et al, 2009).

A leptospirose é a zoonose de propagação mais ampla em todo o mundo, presente em todos os continentes com exceção da Antártida, sendo encontradas provas da presença desta bactéria em praticamente todas as espécies de mamíferos já examinados (LEVETT, 2004). Tradicionalmente, a classificação taxonômica da *Leptospira* é realizada através de testes sorológicos, sendo a unidade básica o sorovar (DIKKEN & KMETY, 1978; TERPSTRA, 1992). Porém, mais recentemente as leptospirosas passaram a ser classificadas através de métodos moleculares, tornando possível uma nova classificação e identificação de espécies genomicamente diferentes, onde além de classificadas em patogênicas (*L. interrogans*) e não patogênicas (*L. biflexa*), foram distribuídas em sorovares, e novos grupos sorológicos, denominados sorogrupos (YASUDA et al., 1987; FAINE et al., 1999; VICTORIA et al., 2008).

Victoria et al. (2008), através da análise filogenética e agrupamento do genoma, indicou que as espécies de *Leptospira* formam um grupo evolutivo único. O subgrupo de saprófitas, que inclui *L. biflexa*, formam o ramo mais profundo dentro do gênero, sendo o outro subgrupo formando por 8 espécies patogênicas como *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Segundo Bharti et al. (2006), outro ramo evolutivo compreende o chamado grupo intermediário que contém espécies de patogenicidade não determinada.

As espécies descritas até o momento incluem quatro genomoespécies que não foram nomeadas e 13 que já nomeadas, homenageando pesquisadores que contribuíram para o avanço no estudo da leptospirose. As oito espécies classificadas como patogênicas são: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. broomii*. As duas espécies consideradas intermediárias são: *L. fainei* e *L. inadai* e as três classificadas como saprófitas são: *L. meyeri*, *L. wolbachii* e *L. biflexa* (YASUDA et al., 1987; RAMADASS et al., 1992; PEROLAT et al., 1998; BRENNER et al., 1999; LEVETT et al., 2006; VICTORIA et al., 2008).

No Brasil, *L. interrogans* é considerada a espécie mais disseminada no ecossistema brasileiro, onde os sorovares Copenhageni e Canicola representam mais de 90% dos casos de leptospirose no país (KO et al., 1999; PEREIRA et al., 2000). Por outro lado, as espécies *L. borgpetersenii* e *L. santarosai* estão relacionadas com a enfermidade em animais de produção, silvestres e roedores sinantrópicos (FAINE et al., 1999; LILENBAUM et al., 2008b).

A persistência das leptospiros nos rins pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal (XUE et al., 2009). A infecção pode causar hemorragia pulmonar, falha renal e hepática, porém algumas vezes, conduz a falhas de múltiplos órgãos, levando o hospedeiro à morte (LEVETT, 2001; MCBRIDE et al., 2005).

A incidência da infecção é maior nos trópicos do que em regiões temperadas e a infecção ocorre tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento. De acordo com Fornazari et al. (2012), apesar do conhecimento sobre o ciclo do patógeno, as taxas de incidência são subestimadas devido à falta de conscientização sobre a doença e diagnósticos relativamente inacessíveis e insuficientemente rápidos.

O papel dos reservatórios, ganha destaque de relevância na epidemiologia da leptospirose, onde estes, doentes ou sadios, excretam a bactéria de forma intermitente ou regularmente, por períodos de meses, anos ou durante toda sua vida, favorecendo a persistência de focos da doença (XUE et al., 2009; ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

A prevalência dos diferentes sorovares dentro de um rebanho, depende da presença de espécies reservatórias, e sorotipos circulantes, associadas as condições ambientais, tipos de ocupação e práticas agrícolas. Várias associações a sorovares parecem ser onipresente, por exemplo, entre a espécie *Rattus spp.* e sorovares Icterohaemorrhagiae e Ballum (PLANK & DEAN, 2000).

Teoricamente, qualquer sorovar de *Leptospira spp.* pode infectar qualquer espécie animal, mas na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção será determinada pelas espécies animais em contato aos sorovares naquela região, pelas condições ambientais e climáticas, dependendo do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ et al., 2006).

Os ovinos são considerados menos suscetíveis a leptospirose do que outras espécies de animais domésticos, entretanto a leptospirose clinicamente aparente em ovinos está associada a alguns sorovares como Pomona, Gippetiphosa, Icterohaemorrhagiae, Serjoe e Hardjo (LILENBAUM et al., 2008b; ZAMORA et al., 1999). De acordo com Ciceroni et al. (2000), apesar dos ovinos serem menos suscetíveis, a infecção por leptospirosas patogênicas é geralmente assintomática, podendo ocorrer surtos da doença com episódios de aborto e morte de cordeiros. Tal como observado em bovinos, em ovinos ocorre queda na produção de leite, o que agrava as condições da prole, onde os borregos podem morrer tanto pela infecção congênita, bem como por inanição provocada pela agalaxia (MARTINS & LILENBAUM, 2014). Em caprinos, a forma aguda da doença também leva a ocorrência de abortamentos, onde os animais acometidos apresentam-se apáticos e dispnéicos, podendo eliminar a bactéria num período superior a sessenta dias após a infecção (HIGINO, et al., 2013; LILENBAUM et al., 2008a).

Apesar da transmissão de leptospirosas estar associada à exposição à urina infectada, o DNA leptospiral foi detectado no sêmen de equinos (HAMOND et al., 2012), bovinos (VINODH et al., 2010), suínos (ALTHOUSE et al., 2011), caprinos (LILEBAUM et al., 2009) e ovinos (LILENBAUM et al., 2008a), em infecções clínicas e subclínicas, sugerindo a participação do sêmen na transmissão venérea desta bactéria (LILENBAUM et al., 2008a; MARTINS et al., 2012; HAMOND et al., 2012; MARTINS & LILENBAUM, 2014).

Para determinar a ocorrência da leptospirose em um rebanho, indica-se a associação de técnicas de diagnóstico, ou seja, a combinação de provas sorológicas e bacteriológicas (QUINN et al., 2005). O isolamento, método definitivo para diagnóstico, pode ser realizado através de diluições da amostra de forma seriada na base 10, em meios apropriados para o cultivo, tais como: Fletcher, Stuart, Noguchi, Korthof, Ellinghausen-McCullough, Meio Modificado de Johnson e Harris (EMJH) e Tween-albumina (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A bioprova, com isolamento do agente através de inoculações em animais de laboratório, também pode ser realizada, porém é considerada um método

lento, onde a incubação pode ser superior a 13 semanas, e com elevado risco biológico para o manipulador (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os métodos sorológicos mais utilizadas no diagnóstico da leptospirose são a Soroaglutinação Microscópica (SAM), sendo este o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAINE et al., 1999) e o teste de ELISA que detectam especificamente anticorpos da classe IgM e IgG, o que pode acarretar em resultados falso-positivos quando relacionados a histórico de vacinação do rebanho (SOTO et al., 2007).

A prevenção da doença no rebanho baseia-se em práticas que envolvem drenagens de áreas alagadiças e eliminação do contato entre animais suscetíveis e portadores, tais como roedores (SARAZÁ & SÁNCHEZ-VAZCAÍNO, 2002), enfatizando ainda a utilização de soluções desinfetantes na limpeza das instalações (SOBESTIANSKY et al., 2007). A utilização de vacinas comerciais de *Leptospira* tem sido difundida globalmente, principalmente nas espécies bovina, suína e canina. São compostas de bacterinas ou bactérias inativadas por processos químicos, porém mostram efeitos parciais nas práticas de controle da doença, uma vez que podem variar nos tipos de sorovares utilizados em sua composição e a presença destes no local de criação (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Para o sucesso de programas vacinais em um rebanho são necessários contínuos inquéritos soro-epidemiológicos para o conhecimento dos diferentes sorovares circulantes na população de estudo (WANG et al., 2007)

3.2.5. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida e Família Sarcocystidae, sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 1994).

A toxoplasmose é uma doença de caráter zoonótico e cosmopolita, acometendo uma infinidade de espécies, como o homem e outros animais de sangue quente, onde os animais de produção, como os suínos e ovinos, são citados como as espécies mais acometidas, seguidas dos caprinos e leporinos (DUBEY & THULLIEZ, 1999).

Os felídeos são os únicos hospedeiros que eliminam oocistos do parasita resultantes da fase sexuada do ciclo (DUBEY, 2009a). Infecções primárias por *Toxoplasma gondii* podem gerar diferentes distúrbios reprodutivos, entre eles abortos, absorção fetal, mumificação fetal, repetição de cio, nascimento de neonatos mortos ou fracos que evoluem para óbito (DUBEY, 2009b). Desde 1954, é apontado como agente

de abortamentos e sendo considerada a maior causa de problemas reprodutivos na espécie ovina (UNDERWOOD & ROOK, 1992). Prejuízos anuais de US\$ 1,4-4,7 milhões foram associados à toxoplasmose em rebanhos ovinos no Uruguai (FREYRE et al., 1997).

O ciclo biológico do parasita envolve duas fases distintas: assexuada, nos tecidos dos vários hospedeiros e, sexuada no epitélio intestinal de gatos jovens (NEVES, 2005). Os gatos e outros felídeos se infectam por via oral por meio da ingestão de oocistos, cistos (com bradizoítos) ou taquizoítos. A partir daí, eliminam em suas fezes os oocistos gerados no interior de suas células epiteliais intestinais. O oocisto infectante, ingerido pelos hospedeiros intermediários liberam esporozoítos, que invadem o epitélio intestinal e liberam os taquizoítos, que alcançam a circulação e a linfa, podendo se desenvolver em várias células do hospedeiro (HINRICHSSEN, 2005).

Três vias primárias de transmissão de *Toxoplasma gondii* foram estabelecidas por Dubey (1986): a via congênita, o carnivorismo e a via fecal oral. Hábitos de ingerir carne e produtos crus ou mal cozidos de origem animal têm grande importância na epidemiologia da toxoplasmose. Sugeriu-se, recentemente, que a contaminação ambiental por oocistos é relativamente menos importante na infecção para ovinos e caprinos, sendo a transmissão vertical de maior importância epidemiológica (BUXTON et al., 2006).

Formas infectantes de *Toxoplasma gondii* já foram isoladas em amostras de sêmen de diferentes espécies: em caprinos (SANTANA et al., 2013), suínos (MOURA et al., 2007), bovinos (SCARPELLI et al., 2009) e ovinos (SPENCE et al., 1978; LOPES et al., 2009; MORAES et al., 2010a).

Arantes et al. (2009) observaram soroconversão e reabsorção fetal em cadelas experimentalmente inseminadas com doses de sêmen contaminados com *Toxoplasma gondii*.

Moraes et al. (2010b) comprovaram a infecção em ovelhas utilizando diferentes doses de taquizoítos no sêmen utilizado para inseminação artificial, resultando em morte embrionária na fase aguda de infecção, anestro persistente, hidrometra, mucometra e cistos foliculares.

Recentemente, Santana et al. (2013) e Lopes et al. (2013) comprovaram a transmissão sexual de *T. gondii* na espécie caprina e ovina, respectivamente, onde ambos os estudos utilizaram machos, infectados com taquizoítos por via oral e subcutânea para a monta natural de fêmeas soronegativas. Wanderley et al. (2013) caracterizaram a transmissão de *Toxoplasma gondii* em cabras experimentalmente infectadas pela via

vaginal, utilizando sêmen contaminado com a cepa CPG (genótipo III), observando soroconversão com diferentes titulações e a presença do DNA do parasita no sangue.

Alterações na qualidade espermática também foram citadas em diferentes espécies inoculadas com este parasita. Em camundongos, Terpsidis et al. (2009) observaram significativa diminuição na concentração e motilidade espermática com presença de anormalidades substanciais após 30-40 dias pós-inoculação. Lopes et al. (2009) observaram diminuição no volume do ejaculado de carneiros experimentalmente infectados, quando comparados aos do grupo controle. Moura et al. (2007) afirmaram que o efeito direto de *Toxoplasma gondii* na espermatogênese pode ser acompanhado pelo aumento na frequência de patologias espermáticas primárias.

O diagnóstico da toxoplasmose ovina baseia-se em métodos de pesquisa indiretos, principalmente na detecção de anticorpos das classes IgM e IgG, estabelecendo a fase de infecção, no qual o animal se encontra. As principais técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da toxoplasmose, de grande eficiência e rapidez, são: a técnica de Sabin-Feldman; a Hemaglutinação (HA), a Fixação do Complemento (FC), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e o Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA), e como padrão-ouro, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), (UCHOA et al., 1999).

Por ser um agente responsável por grandes prejuízos econômicos, principalmente em rebanhos ovinos, com significativos aumentos nos custos de produção e queda na comercialização da carne (DUBEY, 2009a), a adoção de medidas de controle e eliminação dos fatores de risco associados a transmissão, devem ser tomados como fundamentais pelos criadores, ficando ainda necessária a inclusão da doença em campanhas governamentais de controle, uma vez que tal agente assume grande importância reprodutiva.

3.2.6. *Neospora caninum*

Neospora caninum é um coccídio intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae; é morfologicamente similar ao *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2002; DUBEY & SCHARES, 2011).

O ciclo biológico de *Neospora caninum* apresenta duas fases distintas: a fase assexuada que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários por multiplicação rápida (taquizoítos) e multiplicação lenta (bradizoítos), e a fase sexuada que ocorre no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, que são os únicos com potencial de eliminar

oocistos no ambiente. Três estágios infectantes são observados: bradizoítos (no interior de cistos teciduais), taquizoítos e oocistos, contendo esporozoítos e todos envolvidos na transmissão do agente (MCALLISTER et al., 1998; BUXTON et al., 2002; DUBEY et al., 2002).

Como hospedeiros definitivos já são confirmados: o cão (*Canis lupus familiaris*), o coiote (*Canis latrans*), o dingo (*Canis lupus dingo*) e o lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY & SCHARES, 2011). Como hospedeiros intermediários naturais são citados: os bovinos (THILSTED & DUBEY, 1989; ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991), os ovinos (DUBEY & LINDSAY, 1996), os caprinos (CORBELLINI et al., 2001), equinos (MARSH et al., 1994), os cervídeos (WOODS et al., 1994; DUBEY et al., 1999), os búfalos (RODRIGUES et al., 2004) e as aves (pardais e galinhas) (COSTA et al., 2008; GONDIM et al., 2010).

Clinicamente, a Neosporose manifesta-se por problemas reprodutivos, sendo uma importante causa de aborto, principalmente em bovinos, podendo ainda causar nascimento de crias debilitadas e natimortos (ALMERÍA & LÓPEZ-GATIUS, 2001; DUBEY, 2003).

O primeiro relato da infecção congênita na espécie ovina foi feito em 1990 por Dubey (DUBEY, 2003) em um cordeiro com sinais de ataxia e fraqueza após o nascimento. Posteriormente, novos relatos da infecção foram descritos em diferentes regiões no mundo, incluindo Japão, América do Sul, Austrália, Suíça, Itália, Espanha e Nova Zelândia (KOYAMA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2001; HASSIG et al., 2003; MOORE, 2005; MASALA et al., 2007; MORENO et al., 2012; REICHEL et al., 2008; HOWE et al., 2008; BISHOP et al., 2010).

Em ovinos, estudos recentes têm relacionado a participação deste parasita em casos de aborto, com a identificação do agente em órgãos de fetos abortados (KOBAYASHI et al., 2001; HÄSSIG et al., 2003; HUGHES et al., 2006; MASALA et al., 2007; HOWE et al., 2008; ABO-SHEHADA & ABU-HALAWEH, 2010), onde as lesões fetais foram semelhantes aquelas causadas por *Toxoplasma gondii* (DUBEY & LINSAY, 1990). Moreno et al. (2012) salientaram que a infecção por *Neospora caninum* em abortos em ovelhas, pode ser tão frequente quanto a originada por *Toxoplasma gondii*.

No Brasil, estudos realizados por Socarrás et al. (2001) demonstraram que ovelhas deslanadas são suscetíveis à infecção experimental com *Neospora caninum* e a infecção intra-uterina resulta no nascimento de cordeiros clinicamente normais, porém congenitamente infectados.

Na Bahia, a ocorrência de anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* foi estudada em amostras de ovinos de 10 rebanhos pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI); observando que 7,4% dos animais foram positivos e dos rebanhos estudados, seis apresentaram ovinos sororreagentes (GONDIM et al., 2010). Faria et al. (2010) em um estudo pioneiro no estado de Alagoas, também utilizando a RIFI, testaram 343 amostras, e identificaram 9,6% de positividade para anticorpos IgG anti-*Neospora caninum*, com variadas titulações, onde 14 rebanhos (53,8%), apresentaram pelo menos um animal soropositivo.

Romanelli (2007) realizaram estudo soro-epidemiológico em ovinos no município de Guarapuava, Paraná, e observaram 9,5% de reações positivas com ponto de corte de 1:100. Figliuolo et al. (2004) também utilizaram a RIFI (com ponto de corte 1:50) em amostras de soros de ovinos e detectaram 9,2% dos animais positivos no estado de São Paulo.

A transmissão de *Neospora caninum* via sêmen foi demonstrada na espécie bovina, quando utilizados touros soropositivos para *Neospora caninum* com confirmação molecular da presença de DNA do agente no sêmen em infecções naturais (ORTEGA-MORA et al., 2003; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004; MOORE, 2005; FERRE et al., 2008), bem como em infecções experimentais (SERRANO-MARTINEZ et al., 2007; FERRE et al., 2008), com variações nos títulos sorológicos e presença de parasitemia nas fêmeas relacionada a dose-dependência do inóculo utilizado (SERRANO-MARTINEZ et al., 2007). Estudos de Masuda et al. (2007) levantaram maiores hipóteses sobre o papel do sêmen como meio potencial para transmissão, demonstrando que camundongos (CB-17 e BALB/c), quando inoculados com 2×10^5 taquizoítos foram capazes de transmitir a infecção para fêmeas através da cópula, confirmando tais resultados pela detecção de taquizoítos nos órgãos tanto das fêmeas como de suas crias por métodos moleculares e imunohistoquímicos. Em um estudo recente e pioneiro na espécie ovina, Syed-Hussain et al. (2013) detectaram a presença de DNA de *Neospora caninum* de forma intermitente no sêmen de carneiros experimentalmente infectados, com concentrações entre 1-899 taquizoítos por mL de sêmen ejaculado, mesmo cinco semanas após a inoculação.

O diagnóstico da infecção é realizado utilizando-se mais de uma técnica de diagnóstico (JENKINS et al., 2004). Dentre elas, a técnica de referência para fetos abortados é o exame histopatológico dos tecidos fetais (DUBEY, 2003). Para a pesquisa de anticorpos nos animais adultos recomenda-se a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como referência, além do Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Além dos testes

sorológicos, ainda pode ser realizado o isolamento do parasito em cultivo celular ou em bioensaios (LINDSAY et al., 1999).

As medidas de controle aplicadas para combater a infecção congênita baseiam na redução do número de animais infectados mediante o descarte e reposição seletiva (JENSEN et al., 1999).

A aplicação de medidas higiênicas para prevenir a infecção dos animais soronegativos e a redução da contaminação ambiental pelas diferentes fases do parasito (ingestão de fetos, fluidos e restos de placenta por cães, acesso dos mesmos a locais de comida e água para não contaminar o ambiente com oocistos), se enquadram nos critérios profiláticos da doença. Além do controle da população de cães, recomenda-se o controle de roedores, principalmente nos estábulos (DUBEY, 2003).

3.3 Diagnóstico molecular de doenças infecciosas

Os métodos de identificação microbiana tradicionais, em sua maioria, baseiam-se exclusivamente em características fenotípicas dos organismos, tais como: fermentação bacteriana, conidiogênese fúngica, morfologia do parasita, efeitos virais citopáticos, diferenças de perfis isoenzimáticos, sensibilidade antimicrobiana e análise cromatográfica de componentes celulares (TANG et al., 1997). O isolamento microbiológico, técnica ainda considerada como diagnóstico definitivo para certos agentes, envolvem procedimentos laboriosos, lentos (pela natureza fastidiosa no crescimento de certos micro-organismos), a necessidade de meios específicos, muitas vezes de alto custo, e requerem pessoal capacitado para manipulação e interpretação dos resultados, uma vez que nos casos de organismos de alta patogenicidade, são necessários cuidados relacionados aos padrões de biossegurança (YANG & ROTHMAN, 2004; BUYUKCANGAZ et al., 2012). Além disso, o processamento de um grande número de amostras é considerado dificultoso, principalmente quando dez ou mais testes são necessários para a diferenciação de uma espécie em um único grupo. Kits de identificação comercial, como o API e sistemas de identificação automatizados, como o VITEK, tem sido utilizados para a identificação bacteriana (espécie) e tem permitido uma rápida identificação na rotina diagnóstica, porém não sendo tão sensíveis na diferenciação de cepas principalmente para as novas espécies emergentes (SETTANNI & CORSETTI, 2007).

Com o advento da biologia molecular, novas fronteiras foram abertas para a identificação e caracterização de micro-organismos, onde os métodos moleculares se

tornaram revolucionários e complementares no campo do diagnóstico e monitoramento das doenças infecciosas, uma vez que possibilita a identificação de estirpes inviáveis para o isolamento microbiológico (HOLLAND & KIECHLE, 2005; MELO et al., 2012); requerem apenas pequenas quantidades de DNA, podendo este estar presente em diferentes tipos de amostras clínicas, e se mostrando uma molécula sem variações ao longo do ciclo de vida do organismos ou sob influências externas do meio (ANDRADE, 1993; FARAH, 1997; GHADERSOHI et al., 1997).

Os primeiros estudos baseados em hibridizações de DNA foram utilizados para identificação de parentesco entre micro-organismos, gerando a formação de conhecimentos bioquímicos precursores para o desenvolvimento das tecnologias aplicadas nos processos de recombinação nucleotídica (TANG et al., 1997). Tais ferramentas, em investigações epidemiológicas, foram substanciais para a rápida identificação da origem, modo de transmissão e eliminação de agentes infecciosos associados a ocorrência de surtos, fundamentais na tomada de decisões profiláticas (BRICKER, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método de amplificação do DNA *in vitro* mais amplamente utilizado, sendo considerado o marco inicial da segunda geração nos métodos moleculares; desde sua introdução em meados da década de 1980, por Karry Mullis, pode ser aplicada em diferentes áreas de conhecimento e ganha destaque como ferramenta no diagnóstico de doenças infecciosas, gerando até hoje, um número crescente de tecnologias associadas (YANG et al., 2005).

O método baseia-se na habilidade da DNA Polimerase em copiar, de forma exponencial, uma região alvo específica de DNA, demarcada por pequenos oligonucleotídeos iniciadores, quimicamente sintetizados (*primers*), conduzindo em amplificações de quantidades detectáveis de DNA a partir de algumas sequências originais (TANG et al., 1997; AHMED & KHOSA, 2010). No PCR, o DNA-alvo (*template*) é copiado através de múltiplos ciclos de aquecimento e arrefecimento em um termociclador, gerando rodadas de desnaturação do DNA alvo, hibridização dos *primers* em suas sequências específicas e extensão da fita complementar pela polimerase termoestável (YANG & ROTHMAN, 2004).

Ao longo das últimas duas décadas, a PCR tem sido extensivamente modificada para expandir sua utilidade e versatilidade, com incremento de sua sensibilidade e especificidade. Vários protocolos tem sido comumente empregados na detecção de regiões específicas microbianas, seja pela utilização de *primers* randômicos, ou pela

hibridização de sondas fluorescentes, bem como por amplificações de regiões intergênicas de grande conservação. Cada protocolo gera uma coleção diferente de impressões digitais genômicas via PCR, que são resolvidos como padrões de bandas de alto nível de resolução taxonômica (SONG, 2005).

São citadas como algumas variantes da técnica: a PCR Nested, que utiliza pares iniciadores internos aos primeiros utilizados, aumentando a amplificação de uma região específica a primeira sequência-alvo, com aumento da especificidade da reação, mesmo em condições limitadas das concentrações de DNA *template* (MANCINI et al., 2010); a RT-PCR, que explora a utilização da enzima transcriptase-reversa para converter RNA em cDNA antes da realização da PCR, sendo uma técnica amplamente utilizada em estudos de expressão gênica; e o método quantitativo, PCR em tempo real (qPCR), que elimina a necessidade do processamento pós-amplificação (eletroforese em gel) e permite a medição simultânea nos produtos obtidos com a síntese do DNA (MARKOULATOS et al., 2002), e através da utilização da tecnologia baseada em sondas específicas, incrementam a especificidade da técnica (GOPAUL et al., 2008; BASSO, et al., 2010).

A PCR Multiplex (mPCR) é outro método variante da PCR convencional, onde duas ou mais sequências de DNA-alvo podem ser amplificadas com a inclusão de mais de um par de *primer* no mesmo tubo de reação, auxiliando na rotina laboratorial, com marcada diminuição no tempo e redução dos custos de processamento (MARKOULATOS et al., 2002). De certo modo, pode ser considerada uma técnica semi-quantitativa, pois a partir de um determinado limite de detecção, pode-se conhecer a real concentração microbiana presente, se mostrando versátil nos diferentes campos da microbiologia para a detecção e diferenciação de micro-organismos, independente de isolamento e cultivo prévio (SETTANNI & CORSETTI, 2007).

Para garantir a especificidade do sistema, a otimização de uma PCR Multiplex envolve o controle de diferentes pontos críticos, desde a escolha cuidadosa dos *primers* utilizados, visando temperaturas similares de anelamento (SONG, 2005), até a eliminação da preferência na amplificação de certos alvos, pela alta ou baixa sensibilidade por determinado *loci* (MARKOULATOS et al., 2002).

A presença de mais de um par de *primer* aumenta as chances na obtenção de produtos de amplificação inespecíficos. A formação dos chamados dímeros de *primers*, ocorre pela extensão de uma fita formada pelo anelamento entre dois *primers* distintos, e é apontada como a principal característica observada em condições de reação com baixas

diluições do DNA *template* na amostra ou quando são utilizados excessos nas concentrações dos *primers* (SETTANNI & CORSETTI, 2007).

Markoulatos et al. (2002) afirmaram que usualmente as concentrações dos *primers* não podem ser superiores a 0,5µM, podendo variar entre 0,04-0,6µM. Concentrações de magnésio afetam diretamente a especificidade no anelamento, determinando a eficiência da reação (MCPHERSON & MOLLER, 2000), somando-se a isso, quantidades limitadas de nucleotídeos (dNTPs), podem inibir rapidamente o processo de amplificação pela PCR. Henegariu et al. (1997) relataram que para cada 200µM de dNTP são necessários 1mM de MgCl₂. Limitações encontradas na detecção, baseiam-se em problemas durante o processo de extração e purificação de DNA, principalmente pela presença de contaminações cruzadas entre as amostras, contaminantes ambientais (instrumentos utilizados) e presença de componentes inibidores de reação, levando a obtenção de resultados falso-positivos/falso-negativos (SONG, 2005; MANCINI et al., 2010).

Várias estratégias recentes são utilizadas para ampliar o espectro de detecção dos diferentes micro-organismos de forma simultânea, independentemente de sua natureza (viral, bacteriana, parasitária), tais como: à amplificação inicial da região intergênica do RNA ribossomal (rRNA) usando *primers* universais (WANG et al., 2009; SONTAKKE et al., 2009), associada a identificação dos produtos da PCR usando sondas espécie-específicas à sequência de DNA analisada, e a incorporação da tecnologia de micro-arranjos (HAYDEN et al., 2008; BASSO, et al., 2010).

3.3.1. *Brucella* spp.

Diferentes estudos baseados em técnicas de PCR para discriminação de espécies do gênero *Brucella* foram descritos ao longo das duas últimas décadas. Os melhores protocolos validados baseiam-se na detecção de sequências gene-específicas de *Brucella* spp. utilizando regiões intergênicas 16S-23S presentes no rRNA; as inserções *IS711*, *per* e *omp2* e o gene *bcsp31*, que codifica uma proteína de 31-kDa (GODFROID et al., 2010). *Primers* arbitrários às proteínas *omp25/omp31*, presentes na membrana dos membros da família *Brucella*, também tem sido empregados, com variações na sensibilidade e especificidade de cada par utilizado (YU & NIELSEN, 2010).

A maior parte das técnicas desenvolvidas foram avaliadas utilizando amostras humanas (QUEIPO-ORTUNO et al, 2005), porém já tem aplicabilidade em amostras clínicas veterinárias (MAYER-SCHOLL et al., 2010; KANG et al., 2011).

Mukherjee et al. (2007) analisaram a sensibilidade e especificidade de três métodos gene-específicos baseados em sequências-alvo para *bcsp31*, *omp2* e 16S rRNA, a fim de obter rápida detecção para ser aplicada em larga escala na detecção de *Brucella* sp. em amostras de sangue bovino e bubalino; concluíram baixa insensibilidade da técnica para a região 16S rRNA em amostras de animais soropositivos, recomendando a combinação da PCR para a região *bcsp31* ou *omp2*. A utilização de mais de um marcador para PCR incrementa a sensibilidade e aumenta a especificidade, resultando em um melhor diagnóstico molecular no processo de triagem de animais de produção (GOPAUL et al., 2008; YU & NIELSEN, 2010).

Imaoka (2007) utilizando quatro PCRs individuais com diferentes combinações de *primers* alvo para *bcsp31* e outras proteínas de membrana (*omp2b*, *omp2a*, *omp31*) obtiveram um eficiente diagnóstico para brucelose humana, capaz de detectar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis* e *B. suis*.

No contexto de diferenciação das espécies envolvidas nos casos de brucelose, protocolos de PCR Multiplex tem ganhado espaço na rotina de diagnóstico. Descrito por Bricker (2003), o AMOS PCR diferencia quatro espécies de *Brucella*: *B. abortus* (biovars 1, 2 e 4), *B. melitensis* (biovars 1, 2 e 3), *B. ovis* e *B. suis* (biovar 1).

Garcia-Yoldi et al. (2006) desenvolveram um PCR Multiplex capaz de identificar todos os biotipos de *Brucellas* isoladas de mamíferos aquáticos e de algumas cepas vacinais (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. suis*). Mayer-Scholl et al. (2010) descrevem um avanço no protocolo de Garcia-Yoldi et al. (2006), somando-se na mesma reação a detecção de mais quatro espécies: *B. microti*, *B. inopinata*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*.

Descrito por López-Gõni et al. (2008), o protocolo de PCR Multiplex, conhecido por Bruce-ladder, é tomado como o mais promissor na diferenciação de cepas vacinais (S19, RB51, Rev.1). E mais recentemente, Kang et al. (2011) demonstraram a amplificação simultânea das 10 espécies de *Brucella* em uma única reação, ressaltando a distinta diferenciação entre as cepas *B. canis* e *B. suis*, antes erroneamente não diferenciadas, com a utilização de um novo set de *primers* de 766 pares de base (pb), alvo para a região 23S do rRNA da bactéria.

A utilização da PCR em tempo real, incrementando os protocolos de PCR Multiplex, tem se mostrado uma técnica promissora para a detecção das espécies de *Brucella* (GOPAUL et al., 2008) e diferenciação entre estados de ativação ou inativação da infecção, nos casos de brucelose humana (QUEIPO-ORTUNO et al., 2005). Uma

desvantagem da qPCR citada por Yu & Nielsen (2010) é a não diferenciação entre algumas cepas de *B. canis* (biovar 3) e *B. suis* (*B. suis* biovar 1), que possuem similaridades alélicas em seus perfis, abrindo espaço para o desenvolvimento de novos protocolos específicos, que possam detectar a presença do agente indiferente do tipo de amostra clínica utilizada.

3.3.2. *Leptospira* spp.

A caracterização dos isolados de *Leptospira* são requisitos básicos nos estudos epidemiológicos. Metodologias baseadas em hibridizações e sequenciamentos têm facilitado a interpretação e classificação das 20 espécies do gênero e seus 270 sorovares (ESLABÃO et al., 2010). Genes *housekeepings* e outros codificantes de proteínas de membranas são utilizados na caracterização molecular, tais como: o gene *rrs* (CERQUEIRA et al., 2009); *lipL41* (HAAKE et al., 1999); *rpoB* (LA SCOLA et al., 2006); *gyrB* (SLACK et al., 2006); o locus S10-spc-a (VICTORIA et al., 2008) e o gene *ligB* (CERQUEIRA et al., 2009), além de regiões intergênicas ao rRNA como a região 16S rRNA, facilitando a classificação das diferentes cepas (ESLABÃO et al., 2010), e em diferentes tipos de amostras clínicas (MÉRIEN et al., 1992; LILENBAUM et al., 2008a).

3.3.3. *Actinobacillus seminis*

Utilizando comparações filogenéticas, com base na região 16S do rRNA, membros da família *Pasteurellaceae* foram reagrupados (CHRISTENSEN & BISGAARD, 2004). Amplamente utilizada no diagnóstico molecular veterinário, para detecção de *Actinobacillus seminis*, o protocolo de PCR simples, descrito por APPUHAMY et al., (1988), alvo para regiões 16S-23S do rRNA, tem se mostrado sensível e eficiente, capaz de diferenciar os quatro tipos de isolados bacterianos em diferentes tipos de amostras.

3.3.4. *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Muitos genes dos organismos Apicomplexas são conhecidos por conter várias sequências repetidas e estes são contribuintes importantes para a antigenicidade de certas proteínas pela composição de seus epítomos, em sua maioria, formando as conhecidas sequências de baixa-complexidade (GOODSWEN et al., 2013).

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são organismos de grande similaridade genômica, com grande áreas de conservação gênica, contendo genes similares que codificam proteínas no mesmo cromossomo, como exemplo, as proteínas da superfamília SRS, sequências relacionadas ao antígeno de superfície SAG1 (REID et al., 2012).

Estudos de filogenética utilizam o RNA ribossomal (rRNA) na construção da árvore evolutiva. Em eucariotos, o rRNA é constituído por quatro subunidades pequenas (ssuRNA): 18S, 5S, 5.8S e por uma grande unidade ribossômica (lsuRNA): 28S, sendo estas utilizadas de forma extensiva nos estudos de filogenia molecular nos organismos Apicomplexa (MORRISON & ELLIS, 1997; MORRISON, 2009; VASOO & PRITT, 2013).

Nas últimas décadas, os métodos baseados em PCR têm progredido para detecção da toxoplasmose congênita e adquirida, utilizando diferentes tipos de amostras clínicas, seja aplicada no diagnóstico da doença em pacientes imunocomprometidos (FALLAHI et al., 2014) ou desenvolvidas para detecção do modelo experimental da infecção em diferentes espécies animais (BASTIEN, 2002). Durante a infecção, *Toxoplasma gondii* é persistentemente encontrado em amostras de tecido e sangue, onde amostras de placenta, cordão umbilical, coração e cérebro ganham destaque como amostras ideais para detecção do parasita pela PCR (MASON et al., 2010).

A utilização de ensaios com alvos de regiões de cópias múltiplas se mostram mais sensíveis para detecção do parasita envolvido na rotina diagnóstica, do que aqueles com alvos de cópia única no genoma (FAHALLI et al., 2012). São citados como alvo do desenho de *primers* para *Toxoplasma gondii*: genes codificantes da α -tubulina e β -tubulina; pequenas subunidades de rRNA do parasita (ITS1 ou 18S); sequências repetidas do gene *REP-52* e como os dois alvos genômicos mais comumente utilizados, as regiões repetidas do gene *B1* (BURG et al., 1989) e a sequência de 529pb, repetida cerca de 200-300 vezes ao longo do genoma do parasita (HOMAN et al., 2000), o que mostra a diversidade nos modelos utilizados e abre espaço para adaptações dos protocolos convencionais para novos protocolos de PCR em tempo real (REISCHL et al., 2003; CASSAING et al., 2006; EDVINSSON et al., 2006; MONTROYA et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2010).

Entre as técnicas, a PCR Nested, seguida pela hibridização, é avaliada como a técnica de diagnóstico mais sensível para a toxoplasmose (KONG et al., 2012). Burg et al. (1989) descreveram uma PCR Nested utilizando como alvo 25-50 cópias de sequências presentes no gene *B1*, técnica amplamente utilizada em tecidos fetais

(WASTLING et al., 1993; BUXTON et al., 2006) e placentas ovinas (BUXTON et al., 2006). Savva et al. (1990) desenvolveram uma PCR Nested utilizando como alvo gene SAG1, porém de sensibilidade reduzida quando comparada a PCR descrita para o gene B1 (WASTLING et al., 1993). Novos protocolos de PCR Nested utilizando como alvo regiões específicas ao gene SAG2 e SAG3 foram descritos por Grigg et al. (2001) e utilizados por Dubey et al. (2008) para obter genótipos específicos do parasita obtidos de bioensaios, facilitando os estudos de filogenia.

A necessidade na rapidez da obtenção no diagnóstico levou ao desenvolvimento de uma nova e promissora estratégia baseada no LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), onde a amplificação de DNA ocorre em um único tubo e é determinada por fotometria. A técnica descrita por Kong et al. (2012) utiliza de forma simultânea sequências alvo para os genes SAG1, SAG2 e gene B1, e em amostras de sangue humano revelou um incremento na sensibilidade de 80-87,5%, quando comparada a PCR Nested utilizando apenas o gene B1, com limites de detecção de 0,1 taquizoíto.

Para detecção de *Neospora caninum* pela PCR são utilizadas na amplificação, sequências baseadas nas subunidades de rRNA, principalmente a região 18S (ELLIS et al., 1994; HO et al., 1997); regiões intergênicas ITS1 (HOLMDAHL & MATTSSON, 1996; PAYNE & ELLIS, 1996), ITS2 e IGS (PAYNE & ELLIS, 1996); antígenos de superfícies, SAG1 e SAG2 (MARSH et al., 1994); o gene Nc-5 (MULLER et al., 1996; YAMAGE et al., 1996) e domínios D de grandes subunidades ribossomais (ELLIS et al., 1999).

Atualmente não existem registros de polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs) registrados para *Neospora caninum*, esperando-se que futuramente os SNPs possam substituir as sequências repetidas de DNA como marcadores ideais, uma vez que o genoma possui baixa taxa de mutação (GOODSWEN et al., 2013). Associando o uso de microsatélites, técnicas baseadas na tipificação de *multilocus* têm sido desenvolvidas, onde hibridizações usando *primers*-fluorescentes seguidos por amplificações com o PCR Nested tem apresentado grande limiar de sensibilidade (PREDAZA-DIAZ et al., 2009; BASSO et al., 2010).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-SHEHADA, M. N., ABU-HALAWEH, M. M. Flock-level seroprevalence of, and risk factors for, *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* v. 93, p 25–32, 2010.

ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, v. 140, n. 3, p.287-296, 2010.

AFSHAR, A., EAGLESOME, M. D. Viruses associated with bovine semen. *Veterinary Bulletin*, v. 60, n. 2, p. 93-109, 1990.

AFZAL, M., TENDERDY, R. P., BRODIE, S. J., DEMARTINI, J. C., ELLIS, R. P., JONES, R. L., KIMBERLING, C. V. Immune experimentally infected with *Brucella ovis*. *Res. Vet. Sci.* v.41, p.85-89, 1986.

AHMED, S., KHOSA, N. An introduction to DNA technologies and their role in livestock production: A review. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, v.20, n.4, p.305-314, 2010.

ALMERÍA, S., LÓPEZ-GATIUS, F. L. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science*, v. 95, p. 303–309, 2013. KOYAMA et al., 2001.

ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D., et al. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: INRA, p.190, 1988.

ANDRADE, L. E. C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. *Ver. Assoc. Med. Bras.*, v.39, p.175-86, 1993.

APPUHAMY, S., LOW, J. C., PARTON, R., COOTE, J. G. Specific PCR primers from the *Actinobacillus seminis*. *J. Applied Microbiol*, 185: 941-948, 1998.

ARANTES, T. P., LOPES, W. D. Z., FERREIRA, R. M., PIERONI, J. S., PINTO, V. M. R. M., SAKAMOTO, C. A., COSTA, A. J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Experimental Parasitology*, v.123, p.190-194, 2009.

BAGLEY, C. V., PASKETT, M. E., MATTHEWS, N. J., STENQUIST, N. J. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J Am Vet Med Assoc*, v.186, p.798-801, 1985.

BARR, B. C., ANDERSON, M. L., DUBEY, J. P., CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary Pathology*, v.28, p.110-116, 1991.

BASSO, W., SCHARES, S., MINKE, L., BÄRWALD, A., MAKSIMOV, A., PETERS, M., SCHULZE, C., MÜLLER, M., CONRATHS, F. J., SCHARES, G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, v.173, p.24-31, 2010.

- BASTIEN P. Diagnosis Molecular: diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hug.*, v. 96, p. 205-15, 2002.
- BAYNES, I. D., SIMMONS, G. C. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J*, v.36, p.454-459, 1960.
- BEZERRA, M. J. G., SANTOS, A. S., CRUZ, J. A. L. O., KÜNG, E. S., SÁ, S. G., JABOUR, F. F., BRITO, M. F., MOTA, R. A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. *Pesq. Vet, Bras.* v.32, n.5, p.369-373, maio, 2012.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E., BUXTON, D.; RODGER, S. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Small Ruminant Research*. v.62, p.43–46, 2006.
- BIBERSTEIN, E. L., MCGOWAN, B., OLANDER, H., KENNEDY, P. C. Epididymitis on rams. Studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, v.54, p.27-41, 1964.
- BIELANSKI, A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, v. 68, p.–22, 2007.
- BISHOP S., KING J., WINDSOR P., REICHEL M.P., ELLIS J. & ŠLAPETA J. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. *Vet. Parasitol.*, v.170, p.137-142, 2010.
- BORGES, A. M., GOUVEIA, A. M. G., SANTOS, R. L. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v. 34, p.160-167, jul/set, 2010.
- BRASIL. Instrução Normativa 87, de 10 de dezembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 dez. 2004.
- BRENNER, D. J., KAUFMANN, A. F., SULZER, K. R., STEIGERWALT, A. G., ROGERS, F. C., WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematics Bacteriology*. v. 49, p.839–58, 1999.
- BRICKER, B. J., EWALT, D. R., OLSEN, S. C., JENSEN, A. E. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest*. v.15, p374-378, 2003.
- BUDDLE, M. B., BOYES, B. W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust. Vet. J.l*, v.29, p. 145-153, 1953.
- BURG, J. L., GROVER, C. M., POULETTY, P., BOOTHOYD, J. C. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 1787-1792, 1989.

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

BUXTON, D. et al. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Small Ruminant Research*, v.62, p.43–46, 2006.

BUXTON, D., MCALLISTER, M. M., DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, v. 18, p.546-552, 2002.

BUYUKCANGAZ, E., SEN, A., CARLI, K. T., KAHYA, S. Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey. *Veterinary Records*. July, v.10, 2012.

CAETANO-DA-SILVA, A., FERRE, I., COLLANTES-FERNANDEZ, E., NAVARRO, V., ADURIZ, G., UGARTE-GARAGALZA, C., ORTEGA-MORA, L. M. Occasional detection of *N. caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. *Theriogenology* 62, 1329–1336, 2004.

CARDOSO, M. R. I., COSTA, M., BORTOLOZZO, F. P., et al. Alterações da morfologia espermática em carneiros naturalmente infectados pela *Brucella ovis*. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.17, p.39-48, 1989.

CARVALHO JUNIOR, C. A., XAVIER, M. N., COSTA, L. F., SANT'ANNA, F. M., BORGES, A. M., GOUVEIA, A. M. G., SANTOS, R. L. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v. 34, p.160-167, jul/set, 2010.

CASSAING, S. B. M. H., BERRY, A., BERREBI, A., FABRE, R., MAGNAVAL, JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by realtime PCR. *J Clin Microbiol*, v.44, p.720–724, 2006.

CERQUEIRA, G. M., PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9, p.760-768, 2009.

CERRI, D., AMBROGI, C., EBANI, V. V., POLI, A., CAPPELLI, F., CARDINI, G., ANDREANI, E. Experimental *Brucella ovis* infection in Mouflon (*Ovis musimon*). *J Wildl Dis*, v.38, p.287-290, 2002.

CHRISTENSEN, E., BISGAARD, M. Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals: A review with special emphasis on diagnosis. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.13-30, 2004.

CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M. Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals: A review with special emphasis on diagnosis. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.13-30, 2004.

CICERONI, L., LOMBARDO, D., PINTO, A., CIARROCCHI, S., SIMEONI, J. Prevalence of Antibodies to *Leptospira* Serovars in Sheep and Goats in Alto Adige–South Tyrol. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 47, n. 3, p.217-223, 2000.

- CLEMENTINO, I. J., ALVES, C. J., AZEVEDO, S. S., PAULIN, L. M., KEMMUEL, A. M. Inquérito soropidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semiárido da Paraíba. *Pesq Vet Bras*, v.27, p.137-143, 2007.
- COLETO, Z. F., PINHEIRO JUNIOR, J. W., MOTA, R. A., GUERRA, M. M. P., SIMPLÍCIO, K. M. M. G., CÂMARA, D. R. et al. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do Estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.27, p.551-553, 2003.
- CORBELLINI, L. G., COLODEL, E. M., DRIEMEIER, D. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J. Vet Diagn. Inv.*, v. 13, n.5, p. 416-419, 2001.
- COSTA, K. S., SANTOS, S. L., UZEDA, R. S., PINHEIRO, A. M., ALMEIDA, M. A., ARAUJO, F.R., MCALLISTER, M. M., GONDIM, L. F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v.38, p.157-159, 2008.
- COUSINS, D. V., LLOYD, J. M. Rapid identification of *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* using the API ZYM System, *Veterinary Microbiology*, v. 17, p.75-81, 1988.
- CRBA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2nd ed. Colégio Brasileiro de reprodução animal (CBRA), Belo Horizonte, 1998.
- CSEH, S., FAIGL, V., AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p.187-192, 2012.
- CULLEN, P. A., HAAKE, D. A., ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS microbiology reviews*, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.
- DE, B. K., STAUFFER, L., KOYLASS, M. S., SHARP, S. E., GEE, J. E., HELSEL, L. O., STEIGERWALT, A. G., VEGA, R., CLARK, T. A., DANESHVAR, M. I., WILKINS, P. P., WHATMORE, A. M. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J. Clin. Microbiol.* v.46, 43-49, 2008.
- DIKKEN, H., KMETZ, E. Serological typing methods of leptospires. In: Bergan, T., Norris, J. eds. *Methods in microbiology*. London: Academic Press, p.259–307. 1978.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep – The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.026, 2009a.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v.39, p.877–882, 2009b.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.205, n.11, p.1593-98, 1994.

DUBEY, J. P., THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts edible tissues of cattle feed *Toxoplasma gondii* oocysts. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, n.2, p.270-273, 1993. FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira* and *Leptospirosis*. *MedSci. Melbourne*, 2nd.ed., 272p. 1999.

DUBEY, J. P. Review of *N. caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol*, v. 41, p. 1–16, 2003.

DUBEY, J. P., SUNDAR, N., HILL, D., VELMURUGAN, G. V., BANDINI, L. A., KWOK, O. C. H., MAJUMDAR, D., SU, C. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the U.S.A. *Int. J. Parasitol.* v.38, p.8–9, 2008.

DUBEY, J. P., BARR, B. C., BARTA, J. R., BJERKAS, I., BJORKMAN, C., BLAGBURN, B. L., BOWMAN, D. D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D. E., HOWE, D. K., JENKINS, M. C., KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A. E., MATTSSON, J. G., et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p.929-946, 2002.

DUBEY, J. P., HOLLIS, K., ROMAND, S., et al. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Int. J. Parasitol.*, v. 29, p. 1709-1711, 1999.

DUBEY, J. P., SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p.90–108, 2011.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, v.67, p.1-59, 1996.

EDVINSSON, B., LAPPALAINEN, M., EVENGARD, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect*, v.12, p.131–136, 2006.

ELLIS, J., LUTON, K., BAVERSTOCK, P.R., BRINDLEY, P.J., NIMMO, K.A., JOHNSON, A.M. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.64, p.303–311, 1994.

ELLIS, J.T., MORRISON, D.A., LIDDELL, S., JENKINS, M.C., MOHAMMED, O.B., RYCE, C., DUBEY, J.P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology*, v.118, n.4, p.357– 362, 1999.

ESLABÃO, M. R., DELLAGOSTIN, O. A., CERQUEIRA, G. M. LepBank: A *Leptospira* sequence repository and a portal for phylogenetic studies. *Infection, Genetics and Evolution*, v.10, p.586-590, 2010.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis, *Medicine*, Melbourne, 1999.

FALLAHI, S., KAZEMI, B., SEYYED TABAEI, S. J., BANDEHPOUR, M.,

LASJERDI, Z., TAGHIPOUR, N., ZEBARDAST, N., NIKMANESH, B., FALLAH OMRANI, V., EBRAHIMZADEH, F. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection with cancer. *Parasitology International*, v.63, p.37-41, 2014.

FARAH, S. B. *DNA segredos e mistérios*. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p. FARIA, E. B., CAVALCANTI, E. F. T. S. F., MEDEIROS, E. S., PINHEIRO-JÚNIOR, J. W., AZEVEDO, S. S., ATHAYDE, A. C. R., MOTA, R. A. *Journal of Parasitology*, v.96, n.1, 197-199, 2010.

FERRE, I., SERRANO-MARTÍNEZ, E., MARTÍNEZ, A., OSORO, K., MATEOS-SANZ, A., DEL-POZO, I., ADURIZ, G., TAMARGO, C., HIDALGO, C. O., ORTEGA-MORA, L. M. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology*, v.62, p.905-911, 2008.

FERRERAS, M. C., MUÑOZ, M., PÉREZ, V., BENAVIDES, J., GARCIA-PARIENTE, C., FUERTES, M., GARCÍA-MARÍN, G. A. J. F. Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* infection in a ram. *J Vet Diagn Invest*, v.19, p.194-197, 2007.

FIGLIUOLO, L. P. C.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; DE PAULA, V. S. O.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti *Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p.161-166, 2004.

FORNAZARI, F., COSTA DA SILVA, R., RICHINI-PEREIRA, V. B., BESERRA, H. E. O., LUVIZOTTO, M. C. R., LANGONI, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *Journal of microbiological methods*, v. 90, n.3, p.321-326, 2012.

FORNAZARI, F., DA SILVA, C. R., RICHINI-PEREIRA, V. B., BESERRA, H. E. O., LUVIZOTTO, M. C. R., LANGONI, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. In kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *Journal of Microbiological Methods*, v. 90, p.321-326, 2012.

FOSTER, G., COLLINS, M. D., LAWSON, P. A., BUXTON, D., MURRAY, F. J., SIME, A. *Actinobacillus seminis* as a cause of abortion in a UK sheep flock. *Vet Rec*, v.144, p.479-480, 1999.

FREYRE, A., et al. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, v.73, p.13-15, 1997.

GALL, D., NIELSEN, K., VIGLIOCCO, A., et al. Evaluation of an indirect-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rum. Res.*, v.48, p.173-179, 2003.

GARCÍA-YOLDI, D., MARÍN, C. M., DE MIGUEL, M. J., MUÑOZ, P. M., VIZMANOS, J. L., LÓPEZ-GOÑI, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis*. *Rev1. Clin. Chem.* v.52, p.779–781, 2006.

GENOVEZ, M. E., DEL FAVA, C., CASTRO, V., GREGORY, L., FERRARI, C. I. L., LANÇA NETO, P., SOUZA, M. R., GOTTI, T. B., OLIVEIRA, J. C. F., PITUCO, E. M. Effect of *Leptospira* spp. serovar Hardjo infection on reproduction of two beef Nelore herds with different serological status. In: World Buiatric Congress in France, v. 24, 2006.

GHADERSOHI, A., COELEN, R. J., HIRST, R. G. Development of specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol.* v.56, p.87-98, 1997.

GILBRIDE, K. A., LEE, D. Y., BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J. Microbiol. Methods*, v. 66, p.1-20, 2006.

GODFROID, J., NIELSEN K., SARGERMAN, C. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med. J.*, v.51, n.4, p.296-305, 2010.

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

GONDIM, L. S., ABE-SANDES, K., UZEDA, R. S., SILVA, M. S., SANTOS, S. L., MOTA, R. A., VILELA, S. M., GONDIM, L. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 168, p. 121-124, 2010.

GOODSWEN, S. J., KENNEDY, P. J. ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the presente. *Infection, Genetics and Evolution*, v.13, p.133-150, 2013.

GOPPAUL, K. K., M. S. KOYLASS, C. J. SMITH, AND A. M. WHATMORE. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.* v.8, p.86, 2008.

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

GRIGG, M. E., GANATRA, J., BOOTHROYD, J. C., MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* v.184, p.633–639, 2001.

GUMBRELL, R. C., SMITH, J. M. B. Deoxyribonucleic acid base composition of ovine Actinobacillosis. *J. Gen. Microbiol.* v. 84, p.399-402, 1974.

GUTIERREZ, J., O'DONOVAN, J., WILLIAMS, E., PROCTOR, A., BRADY, C., MARQUES, P. X., WORRALL, S., NALLY, J. E., BASSETT, H., SAMMIN, D.,

BUXTON, D., MALEY, S., MARKEY, B. K. Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, v.172, p.8-15, 2010.

HAAKE, D. A., MAZEL, M. K., MCCOY, A. M. *et al.* Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and lipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect. Immun.*, v.67, p.6572-6582, 1999.

HAJDU, S. Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Schafen auf Brucellose. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 16: 19--28, 1968.

HAJTÓS, I., FODOR, L. G., GLÁVITS, R., VARGA, J. Isolation and Characterization of *Actinobacillus seminis* Strains from ovine semen samples and epididymitis. *J Med*, v.34, p.138-147, 1987.

HAMOND, C., MARTINS, G., LILENBAUM, W., MEDEIROS, M. A. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. *The Veterinary Record*, v. 171, p. 105-106, 2012.

HÄSSIG, M., SAGER, H., REITT, K., ZIEGLER, D., STRABEL, D., GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 213-220, 2003.

HAYDEN, M. J., NGUYEN, T. M., WATERMAN, A., CHALMERS, K. J. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, v.9, n.80, doi:10.1186/1471-2164-9-80, 2008.

HEATH P.J., DAVIES I.H., MORGAN J.H. & AITKEN I.A. 1991. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in United Kingdom. *Vet. Rec.* 129:304-307, 1991.

HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A., DLOUHY, S. R., VANCE, G. H., VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, n.23, v.3, p. 504-11, 1997.

HIGINO, S. S., SANTOS, F. A., COSTA, D. F., SANTOS, C. S., SILVA, M. L., ALVES, C. J., AZEVEDO, S. S. Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Preventive veterinary medicine*, v. 109, n. 1, p.158-161, 2013.

HINRICHSEN, S. L. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN, p. 421-429, 2005.

HO, M. S. Y., BARR, B. C., ROWE, J. D., ANDERSON, M. L., SVERLOW, K. W., PACKHAM, A., MARSH, A. E., CONRAD, P. A. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J. Parasitol.*, v. 83, p. 508–514, 1997.

HOLLAND, C. A., KIECHLE, F. L. Point-of-care molecular diagnostic systems – past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, v.8, p.504-509, 2005.

HOLMDAHL, O. J. M., MATTSSON, J. G. Rapid sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, 1996.

HOMAN, W. L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J., VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal of Parasitology*, v.30, n.1, p.69-75, 2000.

HOWE, L., WEST, D. M., COLLETT, M. G., TATTERSFIELD, G., PATTISON, R.S., POMROY, W. E., KENYON, P. R., MORRIS, S. T., WILLIAMSON, N. B. The role of *N.caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Ruminant Res.*, v. 75, p. 115–122, 2008.

HUGHES, J. M., WILLIAMS, R. H., MORLEY, E. K, COOK, D. A., TERRY, R. S., MURPHY, R. G., HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*, v. 132, p. 29–36, 2006.

IBGE. Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=20&i=P&c=73>. Acesso 25 janeiro de 2014. Dados 2008.

IMAOKA, K., KIMURA, M., SUZUKI, M., KAMIYAMA, T., YAMADA, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Journal of Infection Diseases*, v.60, p.137–9, 2007.

JANSEN, B. C. The etiology of ram epididymitis. *Vet Res*, v.47, p.101-107, 1980. PETERSON, K., BRINKHOF, J., HOUWERS, D. J., COLENBRANDER, B., GADELLA, B. M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants, *Theriogenology*, v.69, p.433-442, 2007.

JENKINS, M. C., TUO, W. B., DUBEY, J. P. Evaluation of vaccination with *Neospora caninum* protein for prevention of fetal loss associated with experimentally induced neosporosis in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v. 65, n. 10, p. 1404-1408, 2004.

JENSEN, A. M., BJORKMAN, C., KJELDSSEN, A. M., WEDDERKOPP, A., WILLADSEN, C., UGGLA, A., LIND, P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, p.151–163, 1999.

JUNQUEIRA JUNIOR, D. G., ROSINHA, G. M. S., CARVALHO, C. E. G., OLIVEIRA, C. E., SANCHES, C. C., LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Detection of *Brucella* spp. DNA in the semen of seronegative bulls by polymerase chain reaction. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01347.x, 2012.

KANG, S., HER, M., KIM, J. W., KIM, J., KO, K. Y., HA, Y., JUNG, S. K. Advanced Multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species, *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n. 18, p.6726-6728, 2011.

KIRSCHVINK, N., RAES, M., SAEGERMAN, C. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *Vet J*, v.182, p.244-251, 2009.

KO, A. I., GALVAO REIS, M., RIBEIRO DOURADO, C. M., JOHNSON, W. D. JR., RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador. *Leptospirosis Study Group. Lancet*. v. 354, p.820-825, 1999.

KOBAYASHI, Y., YAMADA, M., OMATA, Y., KOYAMA, T., SAITO, A., MATSUDA, T., OKUYAMA, K., FUJIMOTO, S., FURUOKA, H., MATSUI, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J. Parasitol.*, v. 87, n. 2, p. 434– 436, 2001.

KONG, Q. M., SHAO-HONG, L., TONG, Q. B., LOU, D., CHEN, R., ZHENG, B., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites Vectors*, v.5, n.2, 2012.

KOYAMA, T., KOBAYASHI, Y., OMATA, Y., YAMADA, M., FURUOKA, H., MAEDA, R., MATSUI, T., SAITO, A., MIKAMI, T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J. Parasitol.*, v. 87, p. 1486–1488, 2001.

LA SCOLA, B., BUI, L.T., BARANTON, G., KHAMIS, A., RAOULT, D. Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 142–147, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, n. 6, p.435-448, 2004.

LEVETT, P. N., MOREY, R. E., GALLOWAY, R. L., STEIGERWALT, A. G. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *International Journal of Systematics and Evolution Microbiology*, v. 56, p.671–673. 2006.

LILENBAUM, W., VARGES, R., BRANDÃO F. Z., CORTEZ, A., SOUZA. S. O., BRANDÃO. P. E., RICHTZENHAIN, L. J., VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira spp.* in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*, v. 69, p.837-842, 2008a.

LILENBAUM, W., VARGES, R., MEDEIROS, L., CORDEIRO, A. G., CAVALCANTI, A., SOUZA, G. N., RICHTZENHAIN, L. J., VASCONCELLOS, S. A. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 84, n. 1, p. 14-17, 2008b.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P., DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, v. 82, p. 327–333, 1999.

LOPES, W. D. Z., COSTA, A. J., SOUZA, F. A., RODRIGUES, J. D. F., COSTA, G. H. N., SOARES, V. E., SILVA, G. S. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally

infected with *Toxoplasma gondii*. *Animal Reproduction Science*, v.111, p. 312-319, 2009.

LOPES, W. D. Z., RODRIGUEZ, J. D., SOUZA, F. A., SANTOS, T. R., SANTOS, R. S., ROSANESE, W. M., LOPES, W. R. Z., SAKAMOTO, C. A., COSTA, A. J. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.195, p. 47-56, 2013.

LÓPEZ-GOÑI, I., GARDÍA-YOLDI, D., MARÍN, C. M., MIGUEL, M. J., MUÑOZ, P. M., BLASCO, J. M., JACQUES, I., GRAYON, M., CLOECKART, A., FERREIRA, A. C., CARDOSO, R., CORRÊA DE SÁ, M. I., WALRAVENS, K., ALBERT, D., GARIN-BASTUJJI, B. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n.10, 3484-3487, 2008.

MAGALHÃES NETO, A., GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.75-79, 1996.

MANCINI, N., CARLETTIM S., GHIDOLI, N., CICHERO, P., BURIONI, R., CLEMENTI, M. The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, n. 23, v.1, p.235-251, 2010.

MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.*, 16:47-51, 2002.

MARQUES, A. P. R. *Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e Brucella ovis em ovinos no estado de Minas Gerais*. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível online: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SSLA7VGHRK/dissertacao_ana_paula_10_10_06_ap.pdf?sequence=1. Acessado em 12 de dezembro de 2013.

MARSH, A. E., BARR, B. C., MADIGAN, J., LAKRITZ, J., NORDHAUSEN, R., CONRAD, P. A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 209, p. 1907-1913, 1996. WOODS et al., 1994.

MARTINS, G., BRANDÃO, F. Z., HAMOND, C., MEDEIROS, M., LILENBAUM, W. Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. *The Veterinary Journal*, v. 193, n. 2, p. 600-601, 2012.

MARTINS, G., LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, n. 1, p.11-17, 2014.

MASALA, G., PORCU, R., DAGA, C., DENTI, S., CANU, G., PATTÀ, C., TOLA, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 19, p. 96–98, 2007. MORENO, B., COLLANTES-FERNANDEZ, E., VILLA, A., NAVARRO, A., REGIDOR-CERRILLO, J., ORTEGA-MORA, L. M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.*, v. 187, p. 312–318, 2012.

- MASON, S., QUINNELL, R. J., SMITH, J. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. *Veterinary Parasitology*, v.169, p.258-263, 2010.
- MASUDA, T., KOBAYASHI, Y., MAEDA, R., OMATA, Y. Possibility of *N.caninum* infection by venereal. *Veterinary Parasitology*., v. 149, p. 130–133, 2007.
- MAYER-SCHOLL, A., DRAEGER, A., GÖLLNER, C., SCHOLZ, H. C., NÖCKLER, K. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiology Methods*, v. 80, p.112-114, 2010.
- MBAI, K., MUNYUA, S. J. M., GATHUMBI, P. K., MBIUKI, S. M. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. *Small Ruminant Research*, v.21, p.227-231, 1996.
- MCALLISTER, M. M., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., JOLLEY, W. R., WILLS, R. A., MCGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, v. 28, p.1473–1478, 1998.
- MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G., KO, A. I. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 18, p.376-386. 2005.
- MCFARLANE, D., SALISBURY RM, O. H. G., JEBSON, J. L. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust Vet J*, v.28, p.221-226, 1952.
- MCPHERSON, M. J., MOLLER, S. G. Reagents and instrumentation. PCR. *BIOS Scientific Publishers Ltd*, Oxford, pp. 23–60, 2000.
- MELO, A. N., SANTOS JUNIOR, E. R., ADRIÃO, M., WISCHRAL, A. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. *Vet. Bras. Reprod. Anim.* v.36, n.2, p.105-112, 2012.
- MELTZER, E., SIDI, Y., SMOLEN, G., BANAI, M., BARDENSTEIN, S., SCHWARTZ, E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clinical Infectious Diseases*, v.51, p.12-15, 2010.
- MENDONÇA, F. S., DÓRIA, R. G. S., SCHEIN, F. B., FREITAS, S. H., NAKAZATO, L., BOABAID, F. M., PAULA, D. A. J., DUTRA, V., COLODEL, E. M. Febre catarral maligna em bovinos no Estado de Mato Grosso. *Pesq Vet Bras*, v.28, p.155-160, 2008.
- MÉRIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G., SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219–2224, 1992.
- MONTOYA, A., MIRÓ, G., BLANCO, M. A., FUENTES, I. Comparison of nested PCR and real-time for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally cats. *Research in Veterinary Science*, v.89, p.212-213, 2010.
- MOORE, D. P. Neosporosis in South America. *Vet. Parasitol.*, v. 127, p. 87–97, 2005.

- MORAES, E. P. B. X., BATISTA, A. M., FARIA, E. B., FREIRE, R. L., FREITAS, A. C., SILVA, M. A. R., BRAGA, V. A., MOTTA, R. A., 2010. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet. Parasitol.* v.170, 318–322, 2010a.
- MORAES, E. P. B. X., FREITAS, A. C., GOMES-FILHO, M. A., GUERRA, M. M. P., SILVA, M. A. R., PEREIRA, M. F., BRAGA, V. A., MOTTA, R. A. Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during the intrauterine insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p.36-41, 2010b.
- MORRISON, D. A., ELLIS, J. T. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution*, v.14, p.428–441, 1997.
- MORRISON, D. A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology* 25, 375–382, 2009.
- MOURA, A. B., COSTA, A.J., JORDÃO FILHO, S., PAIM, B.B., PINTO, F.R., MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 27, 430–434, 2007.
- MOUSTACAS, V. S., SILVA, T. M. A., COSTA, L. F., XAVIER, M. N., CARVALHO JUNIOR, C. A., COSTA, E. A., PAIXÃO, T. A., SANTOS, R. L. Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, and *Histophilus somni* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, v.9, n.51, doi:10.1186/1746-6148-9-51, 2013.
- MUKHERJEE, F., JAIN, J., PATEL, V., NAIR, M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *Journal of Medical Microbiology*, v.56, p. 1309-1316, 2007.
- MULLER, N., ZIMMERMANN, V., HENTRICH, B., GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.11, p.2850-2852, 1996.
- MYERS, D. M.; SINIUK, A. A. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Appl. Microbiol.*, v.19, p.335-337, 1970.
- NÁREZ, G. M., APARICIO, E. D., ÁLVAREZ, J. F. M., ROMERO, F.A., GÜEMES, F. S. Epididimitis ovina: estudios bacteriológico y serológico. *Vet Méx*, v.30, p.329-336, 1999.
- NEVES, D. P., *Parasitologia Humana*, 11ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 163-172, 2005.
- O'LEARY, S., SHEAHAN, M., SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.*, v.81, p.170-276, 2006.

OFFICE INTERNATIONAL DÈS EPIZOOTIES (OIE). *Código Zoosanitário Internacional dos Animais Terrestres*. Paris: OIE, 2006.

OLSEN, S. C. Porcine brucellosis. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Office Internationale des Epizooties, Paris, pp. 777–784, 2004.

ORTEGA-MORA, L. M., FERRE, I., DEL-POZO, I., CAETANO-DA-SILVA, A., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., UGARTE-GARAGALZA, C., ADURIZ, G. Detection of *N. caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

OSBURN, B. I., KENNEDY, P. C., Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Pathol. Vet.* v.3, p.110-136, 1966.

PAOLICCHI, F. A., CASARO, P. A., GIMENO, E. J., et al. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rum. Res.*, v.36, p.7-15, 2000.

PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., CHRISTOU, L., AKRITIDIS, N. Future trends in human brucellosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 15, p.1141-1149, 2006.

PAYNE, S., ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *International Journal of Parasitology*, v.26, n.4, p.347-351, 1996.

PEDRAZA-DIAZ, S., MARUGAN-HERNANDEZ, V., COLLANTES-FERNANDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., ROJO-MONTEJO, S., GOMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L.M. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. *Vet. Parasitol.* v.166, p.38–46, 2009.

PEREIRA, M. M., MATSUO, M. G. S., BAUAB, A. R., VASCONCELLOS, S. A., MORAES, Z. M., BARANTON, G., SAINT GIRON, I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans Sensu Stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.1, p.450-452, 2000.

PEROLAT, P., CHAPPEL, R. J., ADLER, B., BARANTON, G., BULACH, D. M., BILLINGHURST, M. L., LETOCART, M., MERIEN, F., SERRANO, M. S. *Leptospira fainei* sp nov, isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systematics Bacteriology*. v. 48, p.851–858.1998.

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

PLANK, R., DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes and infection*, v. 2, n. 10, p.1265-1276, 2000.

PLANT, J. W., EMAENS, G. J., SEAMAN, J. T. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.l*, v.63, n.12, p.409-412, 1986.

PUENTE-REDONDO, V., BLANCO, N. G., PÉREZ-MARTÍNEZ, C., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. C., RODRIGUEZ-FERRI, E. F. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. *J Comp Pathol*, v.122, p.217-222, 2000.

QUEIPO-ORTUNO, M. I., COLMENERO, J. D., GARCIA-ORDONEZ, M. A., PACHON, M. E., GONZALEZ, M. et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real time PCR assay melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.11, p.713-718, 2005.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto alegre: Artmed, 2005.

RAMADASS, P., JARVIS, B. D., CORNER, R. J., PENNY, D., MARSHALL, R. B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 42, p. 215–19. 1992.

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

REICHEL, M. P., ROSS, G. P., MCALLISTER, M. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, v.151, p.323–326, 2008.

REICHEL, M. P.; ROSS, G. P.; MCALLISTER, M. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *N. caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. *Vet. Parasitol.*, v. 151, p. 323–326, 2008.

REID, A. J., VERMONT, S. J., COTTON, J. A., HARRIS, D., HILL-CAWTHORNE, G. A., KÖNEN- WAISMAN, S., LATHAM, S. M., MOURIER, T., NORTON, R., QUAIL, M. A., SANDERS, M., SHANMUGAM, D., SOHAL, A., WASMUTH, J. D., BRUNK, B., GRIGG, M. E., HOWARD, J. C., PARKINSON, J., ROOS, D. S., TREES, A. J., BERRIMAN, M., PAIN, A., WASTLING, J. M. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathogens*, v.8, 2012.

REISCHL, U., BRETAGNE, S., KRÜGER, D. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis*, n.3, v.3, p.7-9, 2003.

RIDLER, A. L., WEST, D. M., STAFFORD, K. J., et al. Effects of vaginal *Brucella ovis* infection of red deer hinds on reproductive performance, and venereal transmission to stags. *N Z Vet. J.*, v.50, p. 126-131, 2002.

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

- ROBLES, C. *Brucelosis em carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, p.27, 2008.
- ROBLES, C. A., UZAL, F. A., OLAECHEA, F. V., et al. Epidemiological observations in a Corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Vet. Res. Commun.*, v.22, p.435-443, 1998.
- RODRIGUES, A. A. R., GENNARI, S. M., AGUIAR, D. M., SREEKUMAR, C., HILL, D. E., MISKA, K. B., VIANNA, M. C. B., DUBEY, J. P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.124, p.139–150, 2004.
- ROMANELLI, P. R., FREIRE, R. L., VIDOTTO, O., MARANA, E. R. M., OGAWA, L., DE PAULA, V. S. O., GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 82, p. 202-207, 2007.
- ROOP II, R. M., BELLAIRE, B. H., VALDERAS, M. W., CARDELLI, J. A. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol*, v.52, n.3, p 621-630, 2004.
- ROSSETTI, C. A., GALINDO, C. L., GARNER, H. R., ADAMS, L. G. Transcriptional profile of the intracellular pathogen *Brucella melitensis* following HeLa cells infection. *Microb. Pathog*, nov. v.51, n.5, p.338-344, 2011.
- RYCROFT, A. N., GARSIDE, L. H. Actinobacillus Species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal*, v.159, p.18-36, 2000.
- SANOCKA, D., FRACZEK, M., JEDRZEJCZAK, P., SZUMALA-KAKOL, A., KURPISZ, M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 62, 111-124p, 2004.
- SANTANA, L. F., ROSSI, G. A. M., GASPAR, R. C., PINTO, V. M. R., OLIVEIRA, G. P., COSTA, A. J. Evidence of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in goats. *Small Ruminant Research*, v. 115, p.130-133, 2013.
- SANTOS, R.L., POESTER, F.P., LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad Tec Vet Zootec*, v.47, p.42-56, 2005.
- SARAZÁ, M. L., SÁNCHEZ-VAZCAÍÑO, J. M. Mecanismo de infección de lãs enfermedades animales. *Porcine*, v.68, p.13-26, 2002.
- SAVVA, D., MORRIS, J.C., JOHNSON, J.D., HOLLIMAN, R.E. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.* v.32, p.25–31, 1990.
- SCARPELLI, L.C., LOPES, W.D.Z., MIGANI, M., BRESCIANI, K.D., COSTA, S.A.J. *Toxoplasma gondii* em semen e tecidos de *Bos taurus* and *Bos indicus* experimentalmente infectados. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.29, p.59–64, 2009.
- SCHOLZ, H. C., et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:375–382, 2008.

SCHOLZ, H. C., et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolate from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p.801-808, 2010.

SCHREINER, E., GOMES, M. J. P., CARDOSO, M. I., FERNANDES, J. C. T., HOPE, L. P., LAITANO, J. L. L., FERNANDES, R. E. Epididimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis* em Central de Inseminação artificial no Rio Grande do Sul In: *XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária*. Gramado. p.96, 1992.

SEARSON, J. E. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.4, p.108-109, 1987. SERGEANT, E. S. G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *N Z Vet. J.*, v.42, p. 97-100, 1994.

SERRANO-MARTINEZ, E., FERRE, I., OSORO, K., ADURIZ, G., MOTA, R.A., MARTINEZ,A., DEL-POZO, I., HIDALGO, C.O., ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *N. caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semenwith different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*, v.67, p.729–737, 2007.

SETTANNI, L., CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and-beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*, v.69, p.1-22, 2007.

SLACK, A.T., SYMONDS, M.L., DOHNT, M.F., SMYTHE, L.D. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 6, 95, 2006.

SLEEM, M. N., BOYLE, S. M., SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet. Microbiol.*, v. 129, p.1-14, 2008.

SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. E. S. N., Doenças dos suínos. Goiânia: Cãnone Editorial, p. 768, 2007.

SOCARRÁS, T. J. O. Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum*. 2001. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SOHN, A. H., et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella spp.* *Emerg. Infect. Dis.* 9:485-48, 2003.

SONG, Y., PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, v. 11, p.79-91, 2005.

SONTAKKE, S., CADENAS, M. B., MAGGI, R. G., DINIZ, P. P. V. P., BREITSCHWERDT, E. B. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, v.76, p.217-225, 2009.

SOTO, F. R. M., VASCONCELLOS, S. A., PINHEIRO, S. R., BERNARSI, F., CAMARGO, S. R. Leptospirose Suína. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007.

SPENCE, J.B., BEATTIE, J., FAULKNER, L., WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Vet. Rec.* v.102, n.2, p.38–39, 1978.

SYED-HUSSAIN, S.S., et al., Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. *Vet. Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.002>, 2013.

TANG, Y., PROCOP, G. W., PERSING, D. H. Molecular diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, v. 43, n.11, p.2012-2038, 1997.

TERPSIDIS, K. I., PAPAHAZADADOU, M. G., TAITZOGLU, I. A., PAPAIOANNOU, N. G., GEORGIADIS, M. P., THEODORIDIS, I. T. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. *Experimental Parasitology*, v.121, p.238-241, 2009.

TERPSTRA W. J. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leiden.* v. 60, p.79–87. 1992.

THIBIER, M., GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p.233-251, 2000.

THILSTED, J. P., DUBEY, J. P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.1, p.205-209, 1989. ANDERSON et al., 1991.

TONDER, E. M. V. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J S Afr Vet Assoc*, v.44, p.235-240, 1973.

TORRES, E. D. N; APARICIO, E.D.; QUEZADA, F. V.; et al. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* em sementales ovinos jóvenes. *Vet. Mex.*, v.28, n.3, p.241-245, 1997.

UCHOA, C. M. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.6, p.661-669, 1999.

UNDERWOOD, W. J., ROOK, J. S. Toxoplasmosis infection in sheep. *Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.* v.14, p.1543–1549, 1992.

VAN TONDER, E. M. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the republic of South Africa. III. Growth and cultural characteristics of *A. seminis*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.46, p.141-148, 1979.

VASOO, S., PRITT, B. S. Molecular Diagnostics and Parasitic Disease. *Clin. Lab. Med.*, v. 33, p. 461-503, 2013.

VICTORIA, B., AHMED, A., ZUERNER, R. L., AHMED, N., BULACH, D. M., QUINTEIRO, J., HARTSKEERL, R. A. Conservation of the S10-spc- α locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*, v. 3, n. 7, p. 2752, 2008.

VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, v. 3, n. 12, p.757-771, 2003.

VINODH, R., RAJ, G. D., GOVINDARAJAN, R., THIAGARAJAN, V. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Trop Anim Health Prod*, v.40, p.323-9, 2008.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v. 59, p. 571-584, 2003.

WALKER, R. L., LEAMASTER, B. R. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. *Am. J. Vet. Res.* v.47, p.1928-1930, 1986.

WANDERLEY, F. S., PORTO, W. J. N., CÂMARA, D. R., CRUZ, N. L. N., FEITOSA, B. C. O., FREIRE, R. L. MORARES, E. P. B. X., MOTA, R. A. Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with “CPG” strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v.99, n.4, p.610-613, 2013.

WANG, Y., QIAN, P. Conservation fragments in bacterial 16S rRNA genes and primers design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, v.4, ed.10: e7401. doi: 10.1371/journal.pone.0007401, 2009.

WANG, Z., JIN, L., WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*, v.6, p.39, 2007.

WASTLING, J.M., NICOLL, S., BUXTON, D. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.* 38, 360–365, 1993.

WEBB, R. F., QUINN, C. A., COCKRAM, F. A., HUSBAND, A. J. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Journal*, v.56, p.172-175, 1980.

WENTINK, G. H., FRANKENA, K., BOSCH, J. C., VANDEHOEK, J. E. D., VAN DEN BERG, T. H. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science*, v. 62, p.207-220, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. *WHO Library Cataloguing in Publication Data*, 2003.

WORTHINGTON, R. W., BOSMAN, P. B. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* v.39, p.81-85, 1968.

XUE, F., YAN, J., PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp.* lessons learned from the genomes. *Microbes and infection*, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2009.

YAMAGE, M., FLECHTNER, O., GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific Oligonucleotide Primers for the Detection of Brain "Cyst" DNA of Experimentally Infected Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Parasitology*, vol. 82, p. 272-279, 1996.

YANG, I., KIM, Y. BYUN, J., PARK, S. Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling. *Analytical Biochemistry*. v. 338, 192-200p, 2005. HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A., DLOUHY, S. R., VANCE, G. H., VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. Sep, v.23, n.3, p.504-11, 1997.

YANG, S., ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet. Infectious diseases*, v.4, p.337-348, 2004.

YASUDA, P. H., STEIGERWALT, A. G., SULZER, K. R., KAUFMANN, A. F., ROGERS, F., BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematics Bacteriology*. v. 37, p. 407–415. 1987.

YU, W. L., NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. By Polymerase Chain Reaction. *CMJ*, doi: 10.3325/cmj.2010.51.306, 2010.

ZAMORA, J., RIEDEMANN, S., TADICH, N. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. *Revista Latinoamericana de Microbiologia do Mexico*, v. 41, n. 2, p. 73-76, 1999.

5. ARTIGO

Padronização de PCR multiplex para diagnóstico de agentes infecciosos no sêmen ovino

(Formatado para ser submetido a Revista Journal of Microbiological Methods)

Padronização de PCR multiplex para diagnóstico de agentes infecciosos no sêmen ovino

Standardization of a multiplex PCR for diagnosis of infectious agents in ram semen

Pomy de Cássia Peixoto Kim¹, Rinaldo Aparecido Mota¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com

Abstract

In the present study it was standardized two Multiplex PCR reactions to detect DNA of *Brucella sp.*, *Leptospira sp.*, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. When used positive controls at a concentrations of less than 100ng/ml of genomic DNA it was clearly seen simultaneous amplification of all agents used on both of the reactions. Thereafter these reactions can now be implemented on our laboratory, that way we are going to be able to obtain faster, safer and less expensive diagnosis on those infectious agents.

Key-words: semen, ram, diagnosis, bacteria, protozoa.

Resumo

Neste estudo foi padronizada duas reações de PCR Multiplex para detectar DNA de *Brucella sp.*, *Leptospira sp.*, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Em ambas reações de mPCR, quando utilizados combinações entre os controles positivos em concentrações de DNA genômico igual ou inferior a 100ng/mL, observou-se a amplificação simultânea de todos os agentes pesquisados, podendo assim, ser reproduzida na rotina laboratorial para obtenção de um diagnóstico mais rápido, seguro e menos dispendioso.

Palavras-chave: sêmen, ovino, diagnóstico, bactéria, protozoários.

1. Introdução

Com o advento da inseminação artificial como ferramenta biotecnológica para melhorar a qualidade genética dos rebanhos, a possibilidade de contaminação do sêmen por agentes patogênicos e sua disseminação pela via venérea são uma preocupação para criadores e autoridades veterinárias (AFSHAR & EAGLESOME, 1990).

Diversos agentes infecciosos estão envolvidos em distúrbios reprodutivos nos pequenos ruminantes, estando presentes e em contínua disseminação no rebanho. São responsáveis pela ocorrência de abortos, natimortos, repetição de cio, infertilidade e outras patologias do trato reprodutor que causam consideráveis perdas econômicas aos produtores (TRAMUTA et al., 2011).

No contexto de infertilidade dos reprodutores, a epididimite infecciosa ovina, causada principalmente por *Brucella ovis* e *Actinobacillus seminis* (BURGESS, 1992)

tem se tornado alvo de controle nos programas zoossanitários, sendo listada como doença de notificação obrigatória pela OIE (2006). Agentes como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* sp. e *Leptospira* sp. são incriminados como causa de abortamento em pequenos ruminantes (MENZIES et al., 2011). Na espécie ovina, tais agentes já tiveram sua eliminação documentada no sêmen, sendo este apontado como uma via potencial para transmissão venérea destes micro-organismos (MANTEROLA et al., 2003; LILENBAUM et al., 2008; MORAES et al., 2010; SYED-HUSSAIN et al., 2013).

Com o advento da biologia molecular, diversas técnicas para detecção e diferenciação de micro-organismos foram possibilitadas, favorecendo um aumento da sensibilidade e especificidade de diagnóstico (ZARLENGA & HIGGINS, 2001). A PCR Multiplex é uma variante da PCR convencional, onde duas ou mais sequências alvo podem ser amplificadas através da inclusão de mais de um par de iniciadores na mesma reação, detectando simultaneamente diversos agentes infecciosos que causam síndromes clínicas similares ou idênticas, que compartilhem características epidemiológicas semelhantes (MARKOULATOS et al., 2002). Essa técnica tem se mostrado uma ferramenta eficaz, rápida e de custo reduzido quando comparada às demais técnicas na identificação de vírus, bactérias e parasitas (GUNSON et al., 2008).

Considerando a necessidade da padronização de técnicas de diagnóstico direto para otimizar a detecção de micro-organismos no sêmen de reprodutores ovinos, objetivou-se neste estudo desenvolver uma PCR Multiplex sensível e específica para detecção de *Brucella* sp., *Brucella ovis*, *Leptospira* sp., *Actinobacillus seminis*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em amostras de sêmen ovino.

2. Material e Métodos

2.1 Controles positivos de reação

Para determinar a especificidade dos pares iniciadores utilizados neste estudo foram utilizados como controles positivos da reação culturas bacterianas liofilizadas na concentração inicial de 10^6 UFC/mL de *Actinobacillus seminis* (American Type Culture Collection [ATTC] 15768) e *Brucella ovis* (American Type Culture Collection [ATTC] 25840), suspensão obtida de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa RH obtidos de lavado peritoneal de camundongos previamente infectados e taquizoítos de *Neospora caninum* cepa Nc-Spain 7 cultivados em monocamada de células Marc-145, ambos protozoários obtidos na concentração de 10^7 taquizoítos/mL.

Como controle negativo de reação, adicionou-se água ultrapura (Mili-Q) em substituição ao DNA genômico em cada reação realizada.

2.2 Extração de DNA

As culturas bacterianas liofilizadas foram ressuspensas em 1mL de água ultrapura (Milli-Q) e sofreram tratamento térmico prévio como descrito por Richtzenhain et al. (2002). Para todas as extrações de DNA, tanto das culturas bacterianas, como das suspensões dos protozoários, foi utilizado kit comercial DNEasy Blood & Tissues Kit (Qiagen®) seguindo as recomendações descritas pelo fabricante.

2.3 Escolha dos pares iniciadores

Foram utilizados diferentes pares iniciadores específicos para cada agente, selecionados de diferentes estudos (Tabela 1), considerando o grau de identidade molecular e conservação do fragmento gênico para cada agente pesquisado.

Para *Brucella* sp., os pares iniciadores utilizados (ITS66 e ITS279) são específicos da região interna 16S-23S do rRNA (KEID et al., 2007); para *Brucella ovis* foram utilizados os pares iniciadores descritos por Tsolis (2009) como alvo para ORF Ao503 presente no gene IS711, que se repete múltiplas vezes ao longo dos dois únicos cromossomos da espécie. Para *Leptospira* sp., os pares iniciadores (Lep1 e Lep2) são gênero-específicos para o gene da região 16S do rRNA (MÉRIEN et al., 1992). Para *Actinobacillus seminis* foi utilizado os pares iniciadores (SRJAS1 e SRJAS2) descritos por Appuhamy et al. (1998), específicos para a região interna 16S-23S do rRNA. Para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* foram utilizadas sequências degeneradas como pares iniciadores de amplificação, usando como alvo a região ITS1 situada no gene 18S do rRNA, comum para ambas espécies (HOMAN et al., 1997).

2.4 Reação em cadeia da polimerase

2.4.1 Condições para mPCR 1 (*Brucella* sp. e *Leptospira* sp.)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50µL contendo: 5µL de DNA genômico; 2,5µL de cada primer: ITS66 e ITS279 (10pMol) e Lep1 e Lep2 (50pMol); 5µL de tampão de reação 10X (Reaction Buffer 10X – Qiagen®); 8µL de dNTPs a 10mM (dNTP mix – Qiagen®); 1,5µL de MgCl² a 50mM (Qiagen®); 0,5µL de Taq DNA Polimerase (Qiagen®), na concentração de 5U/mL; 20µL de água ultrapura (Milli-Q). As condições de anelamento empregadas consistiram de uma

desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 1 minuto para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e extensão final de 10 minutos a 72°C.

2.4.2 Condições para mPCR2 (*Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50µL contendo: 5µL de DNA genômico; 1µL de cada primer: SRJAS1 e SRJAS2 (30pMol), Ao503 F e Ao 503 R (50pMol), ITS1 F e ITS1 R (20pMol); 8µL de tampão de reação 10X (Reaction Buffer 10X – Qiagen®); 200µMol de dNTPs (dNTP mix – Qiagen®); 1,5µL de MgCl² a 50mM (Qiagen®); 1 µL de Taq DNA Polimerase (Qiagen®) na concentração de 5U/mL; 28µL de água ultrapura (Milli-Q). As condições de anelamento consistiram de uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 55°C por 1 minuto para o anelamento, 72°C por 2 minuto para a extensão e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para verificar a reprodutibilidade individual de cada par iniciador escolhido, reações de PCR simples foram realizadas para cada agente pesquisado, utilizando os mesmos protocolos e condições térmicas descritos por cada autor. As temperaturas de anelamento específicas para cada par iniciador utilizado individualmente foram sumarizadas na Tabela 1.

Todos os perfis térmicos das etapas de reações adotadas nesse estudo foram realizados em um termociclador XP Thermal Cycler (Bioxer Technology CO. LTD). As condições térmicas para cada reação de multiplex desenvolvida podem ser visualizadas na Tabela 2.

2.5 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Blue Green (LGC®), visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para determinação do peso molecular de cada produto amplificado, foi adicionado à corrida um marcador molecular de 100 pares de base (Promega®).

2.6 Sensibilidade de detecção do mPCR

O DNA obtido dos controles positivos foi quantificado por método fluorométrico, utilizando o aparelho Qiubit (Invitrogen®), determinando assim a concentração inicial

para obtenções de diluições seriadas na base 10 para obtenção do limiar de sensibilidade da técnica, utilizando como concentração inicial 1000ng/mL até 1fg/mL de DNA.

3. Resultados

Nas reações de PCR simples, elaboradas nas mesmas condições descritas para cada agente por seus respectivos autores foram obtidos produtos amplificados com seus pesos moleculares semelhantes ao esperado para cada par iniciador utilizado, onde o limite de detecção foi encontrado na presença de até 1fg/mL de DNA genômico.

Baseando-se no conteúdo GC da composição da sequência de cada par iniciador adotado nesse estudo, com sua direta relação na acurácia da temperatura de anelamento (Tabela 2), duas diferentes PCRs Multiplex foram desenvolvidas, uma capaz de identificar simultaneamente os gêneros *Brucella* sp. e *Leptospira* sp. (mPCR 1) e a outra que identifica a presença simultânea do DNA de *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (mPCR 2) (Figura 1). Observou-se à amplificação dos genes-alvo específicos com seus respectivos pesos moleculares.

Em ambas reações de mPCR, quando utilizados controles positivos em concentrações de DNA genômico igual ou inferior a 100ng/mL para cada espécie observou-se à amplificação simultânea de todos os agentes pesquisados (Figura 1).

4. Discussão

Outras técnicas de mPCR já foram desenvolvidas anteriormente para detectar os mesmos agentes em distintas amostras biológicas (RICHTZENHAIN et al., 2002; MAYER-SCHOLL et al. 2010; TRAMUTA et al., 2011; MOUSTACAS et al., 2013), porém a combinação dos pares iniciadores utilizados nesse estudo é inovador e inédito. Diferentemente da combinação dos pares iniciadores utilizados por Richtzenhain et al. (2002) para detecção de *Leptospira* sp. e *Brucella* sp., neste estudo optou-se pelo emprego dos pares iniciadores descritos por Keid et al. (2007) combinados aos de Mérien et al. (1992), aplicando-se os estudos baseados em genes internos ao rRNA, como ideais para diferenciação entre espécies bacterianas, por serem regiões de maior conservação e diferenciação entre os procariotos (WANG et al., 2009; KANG et al. 2011). A reação para *Actinobacillus seminis* e *Brucella ovis*, descrita por Moustacas et al. (2013) também foi otimizada com o emprego de sequências amplificadoras para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (HOMAN et al., 1997), associando a detecção simultânea de espécies de grande repercussão reprodutiva e de comprovada eliminação no sêmen de ovinos.

Um dos critérios mais importantes tomados na elaboração de uma mPCR é a temperatura de anelamento, uma vez que esta deve ser semelhante para todos os pares iniciadores empregados de forma simultânea (HENEGARIU et al., 1997). Yang et al. (2005) citaram que diferenças superiores a 0,3°C na temperatura de anelamento podem gerar divergências na sensibilidade na formação das bandas específicas em seus pesos moleculares desejados. Para otimizar as reações realizadas neste estudo foi adotado inicialmente diferentes gradientes na temperatura de anelamento e tempo de extensão, porém, os pontos de maior influência na obtenção de uma única temperatura na combinação dos diferentes pares iniciadores foram os ajustes nas concentrações dos tampões utilizados nas reações.

Não foi observada interferência entre os pares de iniciadores quando utilizados de forma combinada (mPCR1 e mPCR2), sem formação de dímeros de *primers* ou fragmentos inespecíficos.

Diferente de outros ensaios que utilizaram amostras de sêmen contaminadas com diluições de cada agente de interesse (RICHTZENHAIN et al., 2002; XAVIER et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2013), a utilização de concentrações variáveis de DNA genômico como padrão do limiar na detecção escolhida nesse estudo, baseou-se na variação fisiológica observada na eliminação desses agentes infecciosos no sêmen, onde a carga bacteriana/parasitária eliminada dependerá do estágio da infecção (aguda ou crônica) (CAETANO-DA-SILVA, et al. 2004; SANOCKA, et al. 2004), o uso de crioprotetores utilizados na preparação das doses para inseminação artificial (EVANS & MAXWELL, 1987) e ainda as potenciais perdas pela degradação de DNA genômico ocorridas nas etapas de extração: desde o transporte da amostra, a natureza dos diluentes empregados na conservação do sêmen, o tipo de técnica empregada para extração e purificação de DNA (KEMP et al., 2006), além da influência no acondicionamento do DNA extraído até a realização dos testes moleculares.

Quando utilizadas combinações entre os controles positivos em suas diferentes concentrações na mPCR2 observou-se variação na amplificação, onde concentrações de DNA de *Actinobacillus seminis* superiores a 100ng/mL impediram a amplificação de DNA de *Brucella ovis* em concentrações abaixo de 10ng/mL, porém não foi observada inibição da amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em concentrações semelhantes ou inferiores quando presentes com primeiro agente citado. As diferenças observadas na amplificação do DNA de *Brucella ovis* quando em contato com grandes concentrações de DNA *template* de *Actinobacillus seminis* foram

semelhantes aos resultados obtidos por Moustakas et al. (2013). A amplificação de várias sequências de DNA em um único tubo na mPCR, diferente da amplificação individualizada em uma PCR simples, leva a uma competição pelos recursos, que são limitados *in vitro*, podendo interferir na quantidade de amplificação de determinada sequência-alvo sobre a outra (YANG et al., 2005). Henegariu et al. (1997) relataram que quantidades de DNA *template* inferiores a 30ng/25µL de reação podem diminuir a eficiência da especificidade da amplificação. A utilização de um único par iniciador degenerado para detecção de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, baseada nas pequenas deleções nucleotídicas na sequência do gene ITS1 se mostra um marcador viável na diferenciação entre ambas espécies, porém não é indicada em estudos filogenéticos mais avançados (HOMAN et al., 1997), sendo necessário o empregado de pares de iniciadores específicos para regiões mais conservadas.

A adoção de uma mPCR otimizada leva a uma simplificação da demanda de serviço em um laboratório de diagnóstico clínico, uma vez que são dispensáveis testes separados para cada tipo de patógeno ou gene de interesse, levando a reduções significativas nos custos gerais, pela redução da utilização de reagentes pós-extração de DNA, bem como a diminuição no tempo de manipulação das amostras (CIRINO et al., 2007; GUNSON et al., 2008).

Para comercialização do sêmen ovino, o Código Zoossanitário dos Animais Terrestres da OIE, recomenda técnicas sorológicas para o diagnóstico de Brucelose Ovina (*Brucella* spp.), Epididimite Ovina (*Brucella ovis*), Agalaxia Contagiosa (*Mycoplasma agalactiae*) e doenças virais como a Artrite-encefalite Caprina (CAEV), Maed-Visna, Língua-azul (OIE, 2006). Determinam o *status* livre da doença dos reprodutores utilizados nas centrais de inseminação, porém não atestam a real qualidade sanitária do sêmen destes animais, uma vez que não é realizada a detecção da presença destes patógenos na amostra (HARE, 1985) o que pode favorecer a introdução destes micro-organismos no rebanho. No Brasil, os animais utilizados em centrais de inseminação credenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são testados sorologicamente a cada 12 meses, para os agentes listados pela OIE. Animais não reagentes podem ter seu sêmen comercializado durante esse intervalo de tempo entre os testes diagnóstico. Em caso de positividade, em um teste posterior, todas as amostras de sêmen coletadas no intervalo entre o teste negativo e o outro positivo devem ser destruídas (BRASIL, 2004). Contudo, a sorologia isoladamente não é suficiente para a detecção direta destes micro-organismos no sêmen e desta forma, a utilização de um

mPCR pode agilizar o diagnóstico, liberando para a comercialização apenas as amostras de ejaculados negativos. Isto garantiria a segurança sanitária do produto final adquirido pelo produtor e maior rentabilidade no processo de comercialização para as centrais de inseminação.

As reações de PCR Multiplex padronizadas neste estudo foram capazes de detectar simultaneamente o DNA de *Brucella* sp., *Burcella ovis*, *Leptospira* sp., *Actinobacillus seminis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* no sêmen ovino, podendo ser empregada como método de diagnóstico na rotina clínica. Além disto, se mostrou um teste rápido, sensível e eficaz e menos dispendioso do que o uso de seis ensaios diferentes para cada agente no PCR convencional.

5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa no período do estudo;

Ao Professor Renato de Lima Santos (Universidade Federal de Minas Gerais) pela doação das cepas liofilizadas de *Brucella ovis* e *Actinobacillus seminis* utilizadas neste estudo.

6. Referências Bibliográficas

Afshar, A., Eaglesome, M.D., 1990. Viruses associated with bovine semen. Veterinary Bulletin, 60 (2), pp. 93-109.

Appuhamy, S., Low, J.C., Parton R., Coote, J.G., 1998. Specific PCR primers from the *Actinobacillus seminis*. J. Applied Microbiol, 185, pp. 941-948.

Brasil. Instrução Normativa 87, de 10 de dezembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. Diário Oficial da União, Brasília, 20 dez..

Burgess, G.W, 1982. Ovine Contagious Epididymitis: A Review. Veterinary Microbiology, 7, pp. 551-575.

Buyukcangaz, E., Sen, A., Carli, K.T., Kahya, S., 2012. Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey. Veterinary Records, 168 (16), pp. 430-430.

Caetano-Da-Silva, A., Ferre, I., Collantes-Fernández, E., Navarro, V., Aduriz, G., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M., 2004. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology, 62, pp. 1329-1336.

- Cirino, N.M, Tavakoli, N.P., Madison-Anetnucci, S.E.G.A.N.C., 2007. Multiplex RT-PCR in microbiology. In: Mackay IM, editor. Real time PCR in microbiology: from diagnosis to characterisation. Caister Academic Press, pp. 183–221.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth, 194 p.
- Gunson, R.N., Bennett, S., Maclean, A., Carman, W.F., 2008. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. *Journal of Clinical Virology*, 43, pp. 372–375.
- Hare, W.C.D., 1985. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. France: Office International des Epizooties, p. 83.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23 (3), pp. 504-11.
- Homan, W.L., Limper, L., Verlaan, M., Borst, A., Vercammen, M., Van Knapen, F., 1997. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 83, pp. 285–289.
- Kang, S., Her, M., Kim, J.W., Kim, J., Ko, K.Y., Ha, Y., Jung, S.C., 2011. Advanced Multiplex PCR Assay for Differentiation of *Brucella* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (18), pp. 6726-6728.
- Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Chiebao, D.P., Salgado, V.R., Megid, J., et al., 2007. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, 68, pp. 1260-1270.
- Kemp, B.M., Monroe, C., Smith, D.G., 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of Archaeological Science*, 33, pp. 1680-1689.
- Lilenbaum, W., Vargas, R., Brandão, F.Z., Cortes, A., De Souza, S.O., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A., 2008. Detection of *Leptospira* spp. in sêmen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 69, pp. 837–842.
- Mancini, N., Carletti S., Ghidoli, N., Cichero, P., Burioni, R., Clementi, M., 2010. The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), pp. 235-251.
- Manterola, L., Tejero-Garce, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J.M., Marin, C. M., López-Goñi, I., 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, 92, pp. 65–72.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M., 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.*, 16, pp. 47-51.

- Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H.C., Nöckler, K., 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiology Methods*, 80, p.112-114.
- Menzies, P. I., 2011. Control of Important Cause of Infectious Abortion in Sheep and Goats. *Vet. Clin. Food Anim.*, 27, pp.81–93.
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 30, pp. 2219–2224.
- Moustacas, V.S., Silva, T.M.A., Costa, L.F., Xavier, M.N., Carvalho Junior, C.A., Costa, E.A., Paixão, T.A., Santos, R.L., 2013. Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, and *Histophilus somni* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, 9 (1), p. 51
- Moraes, E.P.B.X., Batista, A.M., Faria, E.B., Freire, R.L., Freitas, A.C., Silva, M.A.R., Braga, V.A., Mota, R.A., 2010. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Veterinary Parasitology*, 170, pp.318–322.
- Office International des Epizooties (OIE), 2006. Código Zoosanitário Internacional dos Animais Terrestres. Paris.
- Sanocka, D., Fraczek, M., Jedrzejczak, P., Szumala-Kakol, A., Kurpisz, M., 2004. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology*, 62, pp. 111-124.
- Syed-Hussain, S.S., Howe, L., Pomroy, W.E., West, D.M., Smith, S.L., Williamson, N.B., 2013. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. *Veterinary Parasitology*, 197, pp. 534-542.
- Spence, J.B., Beattie, C.P., Faulkner, J., Henry, L., Watson, W.A., 1978. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. *Veterinary Research*, 14, pp.38–39.
- Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S., 2011. Development of a set of multiples standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23 (4), pp. 657-664.
- Tsolis, R.M., Seshadri, R., Santos, R.L., Sangari, F.J., García Logo, J.M., Jong, M.F., Ren, Q., Myers, G., Brinkac, L.M., Nelson, W.C., Deboy, R.T., Angiuoli, S., Khouri, H., Dimitrov, G., Robinson, J.R., Mulligan, S., Walker, R.L., Elzer, P.E., Hassan, K.A., Paulsen, I.T., 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS one*, 4 (5), pp. e5519.
- Wang, Y., Qian, P., 2009. Conservation fragments in bacterial 16S rRNA genes and primers design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS one*, 4 (10), pp. e7401.

Xavier, M.N., Silva, T.M.A., Costa, E.A., Paixão, T. A., Moustacas, V.S., Carvalho JR, C.A., Sant'anna F.M, Robles, C.A., Gouveia, A.M.G., Lage, A.P., Tsolis, R.M., Santos, R.L., 2010. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary microbiology*, 145 (1), pp. 158-164.

Yang, I., Kim, Y. Byun, J., Park, S., 2005. Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling. *Analytical Biochemistry*, 338, pp.192-200.

Zarlenga, D.S., Higgins, J., 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 101, pp. 215–230.

Tabela 1. Pares iniciadores utilizados na PCR simples para cada espécie de patógeno pesquisado, genes-alvo, sequência nucleotídica, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado, segundo os respectivos autores.

PCR simples	Gene-alvo	Sequência	Anelamento	Amplicon(pb)	Referência
<i>Leptospira</i> spp.	16S rRNA	Lep1 5' – GGCGGCGCGTCTTAAACATG – 3' Lep2 5' – TTCCCCCATTGAAGCAAGATT – 3' ITS66 5' – ACATAGATCGCAGGCCAGTCA – 3'	60°C	331	MÉRIEN et al., 1992;
<i>Brucella</i> spp.	16S-23S rRNA	ITS279 5' – AGATACCGACGCAAACGCTAC – 3' Ao503 F 5' – GCCTACGCTGAACTTGCTTTTG – 3'	62°C	214	KEID et al., 2007;
<i>Brucella ovis</i>	ORF Ao503	Ao503 R 5'- ATCCCCCATCACCATAACCGAAG – 3' SRJAS1 5' –CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC – 3'	57°C	228	TSOLIS et al., 2009;
<i>Actinobacillus seminis</i>	16S rRNA	SRJAS2 5'- AAGAAAAAGACGAAGAGACATT – 3'	55°C	436	APPUHAM Y et al., 1998;
<i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	Gene ITS1	ITS1 F 5'- TGGCGCGTTCTGTGCCCCGAAAT – 3' ITS1 R 5'-TGCAITTYGCTGCGKYCTTC – 3'	50°C	555/575	HOMAN et al., 1997;

Tabela 2. Otimização das condições térmicas adotadas nas reações de mPCR para detecção simultânea de agentes patogênicos no sêmen ovino.

Perfil térmico	<i>Leptospira</i> sp. e <i>Brucella</i> sp. (mPCR1)	<i>A. seminis</i> , <i>B. ovis</i> , <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> (mPCR2)
Desnaturação inicial	94°C por 5min	95°C por 5min
Número de ciclos	40	30
Desnaturação de DNA	94°C por 60s	94°C por 60s
Anelamento dos primers	62°C por 60s	55°C por 60s
Extensão de DNA	72°C por 60s	72°C por 2min
Extensão final	72°C por 10min	72°C por 5min

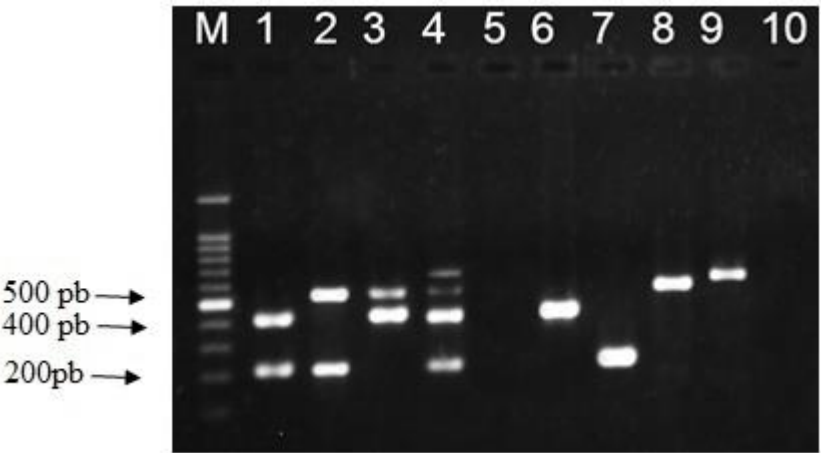


Figura 1. Visualização de produtos amplificados em PCR Multiplex e PCR Convencional, eletroforese em gel de agarose a 1,5%. M: Marcador de peso molecular de 100pb; 1: amplificação simultânea de *Actinobacillus seminis* (436pb) e *Brucella ovis* (214pb); 2: amplificação simultânea de *Brucella ovis* e *Toxoplasma gondii* (555pb); 3: amplificação simultânea de *Actinobacillus seminis* e *Toxoplasma gondii*; 4: amplificação simultânea de *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (575pb); 5: controle negativo da mPCR2; amplificações por PCR Convencional (PCR Simplex), 6: *Actinobacillus seminis*; 7: *Brucella ovis*; 8: *Toxoplasma gondii*; 9: *Neospora caninum*; e 10: controle negativo.

6. ANEXOS

Normas da Revista Journal of Microbiological Methods (Instrução aos autores)