



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE ARAGUAÍNA-TO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA E SANIDADE
ANIMAL DOS TRÓPICOS**

MÁRCIA APARECIDA RODRIGUES

**DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DA EPIDIDIMITE
INFECCIOSA OVINA NO ESTADO DO TOCANTINS**

ARAGUAÍNA (TO)

2020

MÁRCIA APARECIDA RODRIGUES

**DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DA EPIDIDIMITE
INFECCIOSA OVINA NO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos
como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em
Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Patrícia Carvalho da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira
Gomes

ARAGUAÍNA (TO)

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- R696d Rodrigues, Márcia Aparecida .
Detecção dos principais agentes causadores da epididimite infecciosa ovina no estado do Tocantins. / Márcia Aparecida Rodrigues. – Araguaína, TO, 2020.
63 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2020.
Orientadora : Ana Patrícia De Carvalho da Silva
Coorientador: Márcio Giadomoli Teixeira Gomes
1. Epididimite infecciosa ovina. 2. Brucella ovis. 3. Actinobacillus seminis. 4. Histophilus somni. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MÁRCIA APARECIDA RODRIGUES

**DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DA EPIDIDIMITE
INFECCIOSA OVINA NO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientadora: Dr.(a) Ana Patrícia Carvalho da Silva
Coorientador: Dr. Márcio Gianordoli Teixeira
Gomes

Data de aprovação: 18/09/ 2020.

Banca Examinadora:

Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Prof.^a Dr. (a) Ana Patrícia Carvalho Silva/ Orientadora, UFT

Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Prof.^a Dr.(a) Katyane de Sousa Almeida/Examinadora, UFT

Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Prof. Dr. Auricélio Alves de Macedo/ Examinador, UFT

Dedico:

Aos meus pais José de Ribamar
Coelho Rodrigues e Franciana
Coelho Rodrigues.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus de amor, meu conforto, meu sustento, meu consolo e a minha alegria durante todos os momentos, tanto os de tribulação como os de glória. Que cuidou de cada detalhe de um jeito sobrenatural para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais José de Ribamar e Franciana, por toda a sua dedicação e esforço em me ensinar por meio de suas atitudes que eu devo correr atrás bravamente para conquistar um objetivo. Amo vocês!

Ao meu esposo Caio, por me incentivar, da sua maneira, a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha filha Alice, o amor da minha vida, que teve toda a paciência do mundo com a mamãe e que entendeu perfeitamente toda a minha ausência em cada viagem e nos dias de laboratório, e que cuidou da casa e do papai direitinho. Por ser o meu maior incentivo.

Aos meus irmãos Rodrigo e Elis, meu cunhado Marcelino, meus sobrinhos Levi e Rafa, minha tia França, primos Douglas e Andréia, Victória e Catarina por serem a minha base, meu chão, meu acalento. Como eu amo vocês. Sem isso, certamente, eu não chegaria até aqui.

Aos meus sogros Élvio e Miriam por serem referência de conduta e de zelo. Por me incentivarem sempre e me mostrarem que o amor supera todas as coisas. À minha cunhada Suyene por ter me abrigado com tanto amor e carinho durante todas as viagens e pela assessoria não só no experimento como na vida.

Aos meus Pastores amados Amilson e Meiry pelo amparo espiritual, por me mostrarem que quando estamos firmados na rocha, que é Jesus, nada nos abala.

À minha orientadora Ana Patrícia, por me incentivar a buscar minhas conquistas com as minhas próprias pernas. A correr atrás e a ir além. Pela sua amizade e zelo em todas as etapas desse processo.

Ao Professor José Carlos, Prof^a Bruna e equipe, por todo o apoio no laboratório.

À Simoninha, pela flexibilização do laboratório de Palmas e tornar possível a logística desse experimento.

Aos criadores dos ovinos ao longo de todo o Tocantins, que me receberam tão bem em suas propriedades e não mediram esforços para realização desse projeto.

Às equipes de coleta que suaram a camisa junto comigo para chegarmos em cada fazenda e conseguirmos as amostras de cada carneiro Tocantins afora: Marlon, Érica, Fabiane, Denise Andressa, Ariane, Ingridy, Adilson e Juivaldo. Com vocês, tudo ficou mais leve. Vou sentir saudades das nossas coletas e de quanto nós sorrimos juntos.

À Universidade Federal do Tocantins e ao PPGSaspt por terem sido a minha segunda casa.

À Capes pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Muito obrigada!

“Porque eu, o SENHOR, teu Deus, te tomo pela tua mão direita e te digo: não temas, que eu te ajudo.”

Isaías 41:13

RESUMO

A epididimite infecciosa ovina tem ocorrência mundial e é considerada um dos mais importantes processos infecciosos que acometem os carneiros. Os agentes causadores mais comuns são a *Brucella ovis*, o *Actinobacillus seminis* e o *Histophilus somni*. É responsável por grandes perdas econômicas na ovinocultura, uma vez que a presença desses agentes está associada à subfertilidade no rebanho. Bacteriologia do sêmen e da urina aliado a um exame clínico do aparelho reprodutor e testes sorológicos são os métodos de diagnóstico mais comumente utilizados para os três agentes, embora a PCR tenha sido proposta como método alternativo. Além disso, a presença de neutrófilos eliminados no sêmen de carneiros infectados permite que o esfregaço de sêmen seja utilizado para sugerir infecção. O objetivo deste estudo foi detectar os principais agentes causadores da epididimite infecciosa ovina no rebanho tocantinense. Foram colhidas amostras de sangue, sêmen e urina de 88 reprodutores de 21 propriedades nas dez regiões do estado do Tocantins. No exame clínico do trato reprodutivo foram identificadas alterações significativas em 14,77% dos animais. No isolamento bacteriológico das amostras de urina obteve-se isolados com morfologia compatível de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* em 32,95%, 88,63% e 73,86% respectivamente. Nas amostras de sêmen esses valores foram de 47,72%, 84,09% e 73,86%. Já no esfregaço de sêmen foram células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) em 54,54% das amostras avaliadas, sugerindo, portanto, infecção. Foram realizados dois testes ELISAs, um com extrato bruto de *B. ovis* e outro com a proteína BP26r com positividade de 9,09% e 17,04% respectivamente. Obteve-se índice de concordância significativa entre os dois testes sorológicos ($K=0,35$). Estes resultados são suficientes para detectar a presença de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* no Tocantins e, além disso, indicar a ocorrência da epididimite infecciosa ovina nos rebanhos avaliados, auxiliando na adoção de medidas de controle e profilaxia da enfermidade na região.

Palavras-chave: *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Histophilus somni*, diagnóstico, ovinos.

ABSTRACT

Sheep infectious epididymitis has a worldwide occurrence and is considered one of the most important infectious processes that affect sheep. The most common causative agents are *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. It is responsible for large economic losses in sheep farming, since the presence of these agents is associated with subfertility in the herd. Semen and urine bacteriology combined with a clinical examination of the reproductive system and serological tests are the most commonly used diagnostic methods for the three agents, although PCR has been proposed as an alternative method. In addition, the presence of eliminated neutrophils in the semen of infected sheep allows the semen smear to be used to suggest infection. The aim of this study was to detect the main agents that cause infectious sheep epididymitis in the Tocantins herd. Blood, semen and urine samples were taken from 88 breeders from 21 farms in the ten regions of the state of Tocantins. In the clinical examination of the reproductive tract, significant changes were identified in 14.77% of the animals. In the bacteriological isolation of urine samples, isolates with compatible morphology of *B. ovis*, *A. seminis* and *H. somni* were obtained in 32.95%, 88.63% and 73.86% respectively. In the semen samples, these values were 47.72%, 84.09% and 73.86%. In the semen smear, inflammatory cells (neutrophils and lymphocytes) were present in 54.54% of the samples evaluated, thus suggesting infection. Two ELISA tests were performed, one with *B. ovis* crude extract and the other with BP26r protein with 9.09% and 17.04% positivity, respectively. A significant agreement index was obtained between the two serological tests ($K = 0.35$). These results are sufficient to detect the presence of *B. ovis*, *A. seminis* and *H. somni* in Tocantins and, in addition, to indicate the occurrence of infectious sheep epididymitis in the evaluated herds, helping in the adoption of control measures and prophylaxis of the disease in the region.

Keywords: *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Histophilus somni*, diagnosis, rams.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações macroscópicas identificadas no exame clínico de carneiros no estado do Tocantins. **31**

Tabela 2. Média e desvio padrão, em *cm*, de mensuração de circunferência escrotal, dos epidídimos e dos testículos de carneiros no estado do Tocantins. **33**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Distribuição geográfica das propriedades nas dez regiões do estado do Tocantins. 24
- Figura 2:** Alteração macroscópica identificada ao exame clínico em dois carneiros no estado do Tocantins. (A) Assimetria epididimária moderada - aumento de volume da bolsa escrotal por edema (sugestivo de orquite). (B) Assimetria epididimária intensa - aumento de volume da cauda do epidídimo esquerdo. 32
- Figura 3.** Morfologia de colônias bacterianas isoladas do sêmen e urina de ovinos - (A) colônias de *Actinobacillus semini* isoladas de urina, (B) colônias de *Histophilus somni* isoladas da urina e (C) colônias de *Brucella ovis* isoladas de urina. 33
- Figura 4:** Frequência de detecção de *Actinobacillus.seminis*, *Histophilus somni*, e *Brucella ovis* por isolamento bacteriológico de amostras de urina (eixo Y) de reprodutores ovinos no estado do Tocantins. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P \leq 0,05$). 34
- Figura 5.** Frequência de detecção de *Actinobacillus.seminis*, *Histophilus somni*, e *Brucella ovis* por isolamento bacteriológico de amostras de sêmen (eixo Y) de reprodutores ovinos no estado do Tocantins. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P \leq 0,05$). 35
- Figura 6.** Esfregaços de sêmen de ovinos com ausência de células inflamatórias, 10x (A) e presenças discreta (B), Moderada (C) e Intensa (D) de células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos. Coloração por panótico rápido, 40 X. 36
- Figura 7.** Diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* a partir de 88 amostras de soro de ovinos submetidos ao ELISAI (*B. ovis*) no estado do Tocantins. Gráfico de dispersão dos valores de absorvância a 492 nm. A linha pontilhada representa o ponto de corte e os pontos representam a média das repetições. O ponto de corte foi de 1,2253 com média de 0,60075 e desvio padrão de 0,31232. 37
- Figura 8.** Diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* a partir de 88 amostras de soro de ovinos submetidos ao ELISAI (BP26r) no estado do Tocantins. Gráfico de dispersão dos valores de absorvância a 492 nm. A linha pontilhada representa o ponto de corte e os pontos representam a média das repetições o ponto de corte foi de 1,40374 com média e desvio padrão de 0,86766 e 0,27869 respectivamente. 38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. A doença	15
2.2. Infecção por <i>Brucella ovis</i>	16
2.3. Infecção por <i>Actinobacillus seminis</i>	17
2.4. Infecção por <i>Histophilus somni</i>	18
2.5. Patogênese	19
2.6. Achados anatomopatológicos	19
2.7. Métodos de Diagnóstico	20
2.8. Controle e Profilaxia	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Escolha das propriedades e dos animais	24
4.2. Exame Clínico do Trato Reprodutivo	26
4.3. Colheita de material e processamento das amostras	27
4.4. Isolamento Bacteriano	28
4.5. Esfregaço de Sêmen	28
4.6. Elisa Indireto	29
4.6.1 Elisa indireto com extrato bruto de <i>Brucella ovis</i>	29
4.6.2 Elisa indireto com proteína periplasmática recombinante Bp26r	30
4.7. Análise estatística	31
4.8. Dados éticos da pesquisa	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Exame clínico do aparelho reprodutor	32
5.2. Isolamento bacteriano	34
5.3. Esfregaço de sêmen	37
5.4. ELISA indireto com extrato bruto de <i>Brucella ovis</i>	38
5.5. ELISA indireto com a proteína periplasmática recombinante Bp26r	39
5.6. Associação entre os diagnósticos	40
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES	50

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve uma significativa expansão da ovinocultura no Brasil. De acordo com dados colhidos pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em 2018, o efetivo de ovinos no Brasil foi de 18,94 milhões, com uma variação de 1,8% em relação a 2017, sendo a Região Norte responsável por 3,5% (665.370) deste efetivo.

Segundo a EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em 2017 houve um aumento significativo de animais comercializados principalmente nas regiões Nordeste (81,4%) e Norte (29,7%), evidenciando a expansão da ovinocultura no país, e, nesse caso, mais especificamente na região Norte.

Nos últimos 10 anos, o Tocantins se tornou o segundo maior rebanho ovino da região Norte do Brasil, mais que dobrando seu efetivo e chegando a quase 135 mil cabeças. Além disso, conta com grande número de entidades públicas e privadas que se ocupam em dar maior visibilidade à ovinocaprinocultura no Estado (SORIO, 2018).

O crescimento do rebanho acompanha o crescimento da demanda do mercado consumidor, que está cada vez mais exigente, sendo necessária a adoção de medidas que visem não só um aumento na produtividade, mas também na qualidade dos produtos ofertados. Dentre os fatores que mais afetam a produtividade de um rebanho e a qualidade da carne produzida, estão a genética, a nutrição, a sanidade e o potencial reprodutivo dos animais (Pinheiro et al., 2000).

A epididimite infecciosa ovina tem ocorrência mundial e é considerada uma das enfermidades mais importantes que acometem ovinos (POESTER et al., 2013). Pode ser causada por uma variedade de microrganismos incluindo bactérias, vírus, micoplasmas e fungos, no entanto, os agentes causadores mais comuns dessas infecções são a *Brucella ovis*, o *Actinobacillus seminis* e o *Histophilus somni* (CARVALHO JÚNIOR, et al., 2010; MOUSTACAS, et al., 2013; SANTOS, et al., 2017; e EICKSTEIN, 2016). Existem trabalhos sobre esta patologia nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (RAMOS, et al., 1966; MARINHO e MATHIAS, 1966; SCHAFFER, et al., 1997; COLETO, et al., 2003; SILVA, et al., 2003; AZEVEDO, et al., 2004; CLEMENTINO, et al., 2007; MOUSTACAS, et al., 2013; MARTINS, et al., 2013 e EICKSTEIN, 2016).

Como métodos de diagnósticos mais utilizados para epididimite infecciosa ovina, têm-se o isolamento bacteriano e a sorologia (BURGESS, 1982). Walker et al. (1986) e Carvalho Jr et al. (2010) evidenciaram que os ensaios bacteriológicos e sorológicos demonstraram a infecção por *B. ovis* em 79,5% dos carneiros adultos com lesões no epidídimo, sendo que *A. seminis* e

H. somni foram os dois agentes mais frequentemente isolados de carneiros com lesões no epidídimo. Células inflamatórias (neutrófilos) também podem ser encontradas no sêmen de animais infectados pelos três agentes tornando o esfregaço de sêmen um importante método para sugerir infecção (BURGESS, 1982).

Os estudos sobre epididimite infecciosa ovina no Tocantins são escassos, sendo necessários estudos que enfatizem a importância sanitária desta enfermidade. Assim, considerando o crescimento da ovinocultura no estado do Tocantins, a importância da epididimite infecciosa na ovinocultura nacional e a escassez de estudos referentes à situação dessa enfermidade no rebanho do estado, o desenvolvimento deste estudo assume grande importância no cenário da ovinocultura tocantinense, além de iniciar perspectivas no desenvolvimento de novos trabalhos que também almejem controle e profilaxia dessa e de outras enfermidades relacionadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença

A epididimite infecciosa ovina é uma das principais doenças que acometem o aparelho reprodutor de ovinos, resultando em elevado impacto econômico na ovinocultura mundial. As perdas econômicas são devido à redução da qualidade seminal dos reprodutores bem como na redução das taxas reprodutivas como prenhez e natalidade (BURGESS, 1982; CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

É uma enfermidade caracterizada por alterações inflamatórias, envolvendo o epidídimo dos reprodutores e está associada a inúmeros agentes microbianos, dentre bactérias, vírus, micoplasmas e fungos: *Actinobacillus lignieresii*, *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*, *Clamídia psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, e *Yesinia pseudotuberculosis*. (GOMES et al., 2001; CARVALHO JÚNIOR et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2013; SANTOS et al., 2017). *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* são considerados os mais frequentes e determinantes para o estabelecimento dessa enfermidade (BURGESS, 1982).

Há relatos da epididimite infecciosa ovina em todo o mundo (BURGESS, 1982; SANTOS, et al., 2005). O primeiro relato da ocorrência dessa doença em ovinos no Brasil foi realizado por Ramos et al. (1966) no Rio Grande do Sul. Nesse estudo foi realizado inquérito efetuado sobre 3317 reprodutores machos ovinos revelando que 6,5% dos animais apresentaram lesões clínicas de epididimite ovina, confirmada em grande número de casos pelas provas de laboratório. Do total examinado, 10,8% apresentavam lesões palpáveis nos órgãos genitais. Correspondendo, em 60,9% dos casos, às da epididimite ovina. Apenas 11,5% (6/52) dos portadores de lesões típicas de epididimite apresentavam sêmen de aparência normal.

No Piauí através do estudo de Costa (2007) foi observado que 64,1% dos 53 carneiros mestiços apresentaram alterações patológicas onde um animal apresentou (1,9%) hipoplasia de testículo; 35 (66%) alterações degenerativas, sendo 13 (24,5%) relacionadas à degeneração testicular, três (5,7%) para cistos intraepiteliais no epitélio epididimal e 19 (35,8%) para retenção cistos no epidídimo; 11 (20,7%) alterações inflamatórias, sendo cinco (9,4%) relacionadas à epididimite, quatro (7,5%) para orquite e dois (3,8%) para granulomas espermáticos. Além disso, os animais com testículo hipoplásico, degeneração testicular e alterações inflamatórias foram classificadas como subférteis.

No Paraná, Oliveira (2016) identificou anticorpos anti-*B. ovis* e correlacionou com a presença de epididimite em 1,68% do rebanho ovino avaliado.

Em Mato Grosso, Eickstein (2016) identificou 36,1% de animais reprodutores positivos para *A. seminis*, 2,4% para *H. somni* e 7,2% para *B. ovis*. Além disso, foram identificados 16,9% de reprodutores com alteração clínica e 75,0% com presença de infiltrado inflamatório no sêmen.

2.2 Infecção por *Brucella ovis*

A epididimite devido à infecção por *B. ovis* é considerada uma das doenças infecciosas mais importantes que acometem o rebanho ovino em todo o mundo (BURGESS, 1982; XAVIER, et al, 2010; CARVALHO JÚNIOR, 2012; SANTOS, 2017).

Burgess (1982) relata que essa bactéria foi descrita inicialmente na Austrália e na Nova Zelândia na década de 50, sendo apontada como causa de aborto e epididimite em ovinos, sendo, posteriormente observada em vários outros países.

No Brasil foi relatada inicialmente no Rio Grande do Sul por Magalhães Neto e Gil – Turnes (1996), e posteriormente em São Paulo (MARINHO e MATHIAS ,1996), Pernambuco (COLETO, et al., 2003), Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004), Minas Gerais (MARQUES, 2006) e Paraíba (CLEMENTINO et al., 2007). Em 1997, Schafer et al. realizaram um estudo em Santa Catarina, porém não encontraram ovinos reagentes para *B. ovis*. No Tocantins, Martins et al. (2013) determinaram a presença de anticorpos anti-*Brucella ovis* por meio de testes sorológicos em ovinos de 14 propriedades no município de Colinas.

A *B. ovis* é caracterizada como um cocobacilo Gram-negativo, imóvel e não capsulada, que não forma esporos, com tamanho de 0,5 a 0,7 X 0,7 a 1,2 µm. (BURGESS, 1982; CARVALHO JÚNIOR, 2010; BATISTA, et al, 2011).

O crescimento ideal ocorre quando as culturas são incubadas em uma atmosfera de 10% de CO₂ no ar a 37 ° C. Não ocorre crescimento abaixo de 26 ° C. Em meios sólidos, colônias com 5 dias de idade têm até 2 mm de diâmetro, cinza, circulares, convexo, suave e brilhante. O crescimento é fraco, a menos que o meio seja enriquecida com sangue ou soro (BURGESS, 1982).

O sêmen é considerado sua principal via de excreção e sua transmissão ocorre por ingestão e/ou contato sexual com descargas genitais, sendo que as mucosas vaginal e cérvico-

uterina são importantes portas de entrada do agente. (BURGUESS, 1982; CARVALHO JÚNIOR et al., 2010; BATISTA et al., 2011).

Os machos infectados são mais susceptíveis que as fêmeas e eles eliminam intermitentemente a bactéria no sêmen, infectando um grande número de fêmeas e outros machos pelo comportamento homossexual. Acomete geralmente animais adultos e as lesões são praticamente restritas ao aparelho genital, provocando epididimite nos machos, geralmente com lesões palpáveis na cauda do epidídimo e na maioria das vezes, unilateral, além de atrofia testicular levando, conseqüentemente, à baixa fertilidade no rebanho. (COSTA et al., 1998; XAVIER et al., 2010; SALABERRY, 2010; MOUSTACAS et al., 2013; FRANÇA et al. 2014). Os fatores que determinam o tropismo pelo sistema reprodutor ainda são desconhecidos (ANTUNES, 2012).

Carvalho Júnior et al. (2010) relatam ainda que frequentemente os carneiros infectados por *B. ovis* apresentam sêmen de baixa qualidade além de grande quantidade de células inflamatórias (neutrófilos). Segundo os autores, a diminuição na qualidade do sêmen está associada a lesões palpáveis causadas pela *B. ovis*.

2.3 Infecção por *Actinobacillus seminis*

De acordo com Bezerra et al. (2012), o primeiro relato de isolamento de *Actinobacillus seminis* ocorreu na Austrália em 1960 em sêmen de animais com epididimite. No Brasil, foram isoladas no Rio Grande do Sul por Gomes et al. (2001), em São Paulo por Gregory et al. (2009), na Paraíba por Santos et al. (2014).

É um dos principais agentes causais de epididimite ovina, descrita como um bacilo Gram-negativo da família *Pasteurellaceae*, que pode estar em cadeias ou paliçada. Além disso é imóvel e não forma esporos. Seu crescimento ideal ocorre quando são incubadas em uma atmosfera de 10% de CO₂ a 37°C em meios que incluam sangue ou soro (BURGESS, 1982). A infecção se estabelece quando os machos ainda jovens alcançam a maturidade sexual, mas também diagnosticada em animais adultos (DIBARRAT et al., 2006; SANTOS, 2017).

É um habitante natural da mucosa do prepúcio ovino e, geralmente, o estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual ou por deficiências nutricionais predispõe o desenvolvimento de orquite e epididimite por este agente, principalmente em carneiros jovens. Sua infecção é também uma das principais causas de perdas econômicas, reduzindo e interferindo na fertilidade do carneiro infectado. As lesões macroscópicas se

apresentam em forma de epididimite e orquite uni ou bilateral e diminuição do tamanho e consistência testicular, além da presença de neutrófilos no sêmen (NÁREZ et al., 1999; CARVALHO JUNIOR et al., 2010; BEZERRA et al. 2012; e SANTOS et al., 2017).

2.4 Infecção por *Histophilus somni*

Histophilus somni foi isolado pela primeira vez por Roberts (1956), na Austrália. Já o primeiro caso de isolamento de *H. somni* no Brasil foi identificado por Scarcelli et al. (2004) em Campo Grande – MS. É caracterizado por uma bactéria Gram-negativa oval com pequenos filamentos, não capsulada e imóvel, medindo de 0,4 a 0,5 µm de largura por 1 a 3 µm de comprimento (BURGESS, 1982 e CARVALHO JÚNIOR et al., 2010).

Atinge seu crescimento ideal a 37 ° C em atmosfera de 10% de CO² em meios com sangue ou soro como enriquecimento, as colônias são visíveis após 12--18 h sendo circulares, brilhantes, lisas e convexas com cerca de 1 mm em diâmetro. Após 48 h, as colônias têm 3 a 4 mm de diâmetro, branco-acinzentado (BURGESS, 1982).

Também é encontrado na flora bacteriana normal do aparelho reprodutor em ovinos, podendo ser isolado em até 90% do trato urogenital nos machos. A via de infecção nos distúrbios reprodutivos pode ser através de urina, sêmen, muco prepucial e secreção cérvico-vaginal contaminada (NÁREZ et al., 1999 e SCARCELLI et al., 2004).

Em condições de baixa imunidade, está relacionado a outras patologias como mastite, abortos, sinovites e artrites em ovelhas, além da epididimite em carneiros provocando desde edema subcutâneo no escroto até fibrose e aderência da túnica vaginal até cauda do epidídimo. Os testículos apresentam-se consistentes e com aumento de volume, e o escroto e epidídimos vermelhos e doloridos (CARVALHO JÚNIOR et al., 2010).

A infecção se estabelece quando os machos ainda jovens alcançam a maturidade sexual, mas também pode ser diagnosticada em animais adultos. É um habitante natural da mucosa do prepúcio ovino e, geralmente, o estresse induzido por mudanças hormonais durante a maturação sexual ou por deficiências nutricionais predispõe o desenvolvimento de orquite e epididimite, principalmente em carneiros jovens. Sua infecção é também uma das principais causas de perdas econômicas, reduzindo e interferindo na fertilidade do carneiro infectado (DIBARRAT et al., 2006; SANTOS, 2017)

2.5 Patogênese

No caso de infecção por *B. ovis*, sua transmissão ocorre por ingestão e/ou contato sexual com descargas genitais, sendo que as mucosas vaginal e cérvico-uterina importantes portas de entrada do agente. (BATISTA et al., 2011, CARVALHO JÚNIOR et al., 2010; BURGESS, 1982). Observa-se reação sistêmica caracterizada por febre e depressão após a penetração da bactéria no organismo de um animal susceptível por uma das portas de entrada. Depois de duas a oito semanas após a infecção, a bactéria migra para o epidídimo e, assim, células inflamatórias aparecem no sêmen, deteriorando a qualidade do mesmo. Com três semanas após a infecção, já é possível o isolamento da bactéria no sêmen em alguns reprodutores e, após cinco semanas, é possível isolar em todos os infectados. Por volta de nove semanas depois da infecção são detectáveis lesões palpáveis no epidídimo. Em casos agudos pode haver obstrução dos canais do epidídimo com bloqueio da passagem do sêmen através da formação do processo inflamatório que determina aumento de volume dos órgãos afetados. Essa inflamação também pode afetar os testículos (orquite). Já nos casos crônicos a inflamação restringe-se à cauda do epidídimo e os testículos estão diminuídos de tamanho e os sintomas podem regredir, mas os reprodutores permanecem infectados (IASHIZUKA et al., 2005).

De acordo com Foster & Lads 2007) no caso de *A. seminis* e *H. somni* as duas bactérias são habitantes naturais e oportunistas da cavidade prepucial de ovinos após 12 semanas de idade e possivelmente a epididimite se desenvolve pela rota ascendente que as bactérias podem assumir em condições de estresse nutricional, de transporte e trocas hormonais durante a maturação sexual.

2.6 Achados anatomopatológicos

Durante avaliação externa do sistema reprodutor, observa-se aumento de volume nos testículos e epidídimos, dor e aumento da temperatura local à palpação. As lesões macroscópicas se apresentam, em geral, na forma de epididimite e orquite uni ou bilateral e diminuição do tamanho e consistência testicular. Geralmente são observadas lesões palpáveis na cauda do epidídimo como granulomas ou acúmulo de exsudato purulento, na maioria das vezes, unilateral, além de atrofia testicular levando, conseqüentemente, à subfertilidade no rebanho (COSTA et al., 1998; XAVIER et al., 2010; SALABERRY, 2010; MOUSTACAS et al., 2013; FRANÇA et al. 2014). Alguns animais infectados não apresentam alterações

testiculares detectáveis por palpação, sendo então necessários outros testes para estabelecer um diagnóstico preciso (NÁREZ et al., 1999; CARVALHO JÚNIOR et al., 2010).

À microscopia, nos testículos, observa-se espessamento da túnica albugínea, necrose de coagulação e calcificação de túbulos seminíferos, infiltrado inflamatório com predominância de linfócitos entre túbulos seminíferos, no epidídimo observa-se intensa proliferação de tecido conjuntivo ao redor dos ductos epididimários (BEZERRA, 2012). No sêmen, é observada a presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos) (NÁREZ et al., 1999; CARVALHO JUNIOR et al., 2010; BEZERRA et al. 2012; e SANTOS et al., 2017).

Os fatores que determinam o tropismo dessas bactérias pelo sistema reprodutor ainda são desconhecidos (ANTUNES, 2012), porém é sabido que o sêmen é considerado a principal via de excreção das principais bactérias causadoras da epididimite infecciosa ovina

2.7 Métodos de Diagnóstico

Como estão envolvidos agentes etiológicos distintos, onde os mesmos podem estar envolvidos com outras doenças é necessário então unir a presença dos sinais clínicos com testes sorológicos e bacteriológicos para um diagnóstico mais preciso da epididimite infecciosa ovina (BURGESS, 1982).

Moustacas et al. (2013) e Costa et al., (1998) afirmam que o diagnóstico da infecção por *B. ovis* é baseado em exame clínico, testes sorológicos tais como: imunodifusão em gel de ágar (AGID), ELISA indireto e Fixação de Complemento (FC), além de bacteriologia do sêmen ou urina.

Quando utilizado no intuito de demonstrar ausência de infecção em uma população, contribuir com as políticas de erradicação, demonstrar ausência de infecção em animais individualmente e determinar a prevalência da infecção, recomenda-se a utilização do teste ELISA indireto. No que se refere à confirmação de casos clínicos ou suspeitos, esse teste é considerado como um método confiável (OIE, 2015).

Alves et al. (2017) afirmam também que o diagnóstico de maior confiabilidade é obtido por meio do isolamento e identificação do microorganismo em animais suspeitos (padrão ouro) e, dizem ainda que é necessário correlacionar a sorologia à confirmação do isolamento do agente ou por PCR.

Testes sorológicos não estão amplamente disponíveis para o diagnóstico de *A. seminis* e infecções por *H. somni* e, portanto, o diagnóstico é comumente com base em avaliação clínica e bacteriológica do sêmen, embora a PCR tenha sido proposta como método alternativo

(MOUSTACAS et al., 2015). O PCR multiplex possibilita o diagnóstico das infecções por *Brucella* spp., *A. seminis* e *H. somni* com uma única reação, diminuindo gastos com reagentes e o tempo para o diagnóstico diferencial. Uma pesquisa desenvolvida e padronizada na Universidade Federal de Minas Gerais mostrou boa eficiência de detecção desses agentes em carneiros experimentalmente infectados através de um PCR multiplex espécie-específico (Moustacas et al., 2013).

Barrouin-Melo et al. (2007) desenvolveu uma técnica de ELISAI para detecção de *B. canis* em cães, utilizando um extrato de célula bacteriana inteira como antígeno, usando *B. canis* isolado de um animal infectado. Devido a inexistência de um teste sorológico que apresente boa sensibilidade e especificidade para *B. ovis*, França (2013) desenvolveu um teste de ELISA indireto (ELISAI) utilizando como antígeno proteínas recombinantes, BoP59r ou BP26r. Neste estudo, foi confirmado que a BP26r se mostrou eficiente e que, portanto, pode ser utilizada como um bom marcador sorológico da infecção por *B. ovis* em ovinos.

A análise de morfologia espermática e esfregaços de sêmen também têm importância, pois nas infecções provocadas pelos três agentes, o sêmen dos carneiros infectados apresenta diminuição na concentração, motilidade, e aumento no número de defeitos espermáticos totais, diminuindo a sua qualidade, além da presença de grande quantidade de neutrófilos, caracterizando, portanto, a infecção. (MOUSTACAS et al., 2013).

2.8 Controle e Profilaxia

Como medidas de controle Marques (2006) e Carvalho Júnior et al. (2010) apontam algumas medidas como: testes sorológicos semestrais em uma porcentagem significativa do rebanho, com todos os reprodutores; eliminação de ovinos reagentes/infectados; e combinação de exames clínicos e testes sorológicos, antes e depois da estação de monta ou na época da reprodução. Enfatizam ainda que o foco principal do controle para doença é o carneiro e, por isso, recomendam a separação de carneiros velhos dos jovens evitando a transmissão da infecção.

O MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o PNVCEO - Plano de Vigilância e Controle da Epididimite Infecciosa Ovina causada pela *B. ovis* em associação a outros microorganismos, preconizando que o diagnóstico positivo dos animais é de notificação compulsória e aponta como medida de controle o abate sanitário dos animais positivos (BRASIL, 2004).

Ainda não há um esquema vacinal de profilaxia eficaz contra a epididimite infecciosa ovina no Brasil, apenas pesquisas desenvolvendo candidatas à vacina contra *B. ovis*, como por exemplo SILVA et al. (2015a e 2015b), que comprovaram que a cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato é imunogênica no modelo murino e confere proteção a carneiros contra infecção experimental por *B. ovis*.

Há também, como método profilático contra infecção por *B. ovis*, a vacinação de ovinos com a cepa atenuada de *B. melitensis* porém, este protocolo de vacinação não pode ser utilizado em áreas livres de *B. melitensis*, como no Brasil, por exemplo (MARQUES, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Detectar os principais agentes causadores da epididimite infecciosa ovina no rebanho tocantinense, associando-os a doença.

3.2. Objetivos Específicos

- (i) Avaliar a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* eliminadas no sêmen e na urina de reprodutores naturalmente infectados, por isolamento bacteriano, no estado do Tocantins.
- (ii) Avaliar o perfil sorológico de reprodutores ovinos naturalmente infectados por *B. ovis*, no estado do Tocantins.
- (iii) Avaliar a presença de células inflamatórias no sêmen de reprodutores ovinos no estado do Tocantins (método utilizado para sugerir infecção).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Escolha das propriedades e dos animais

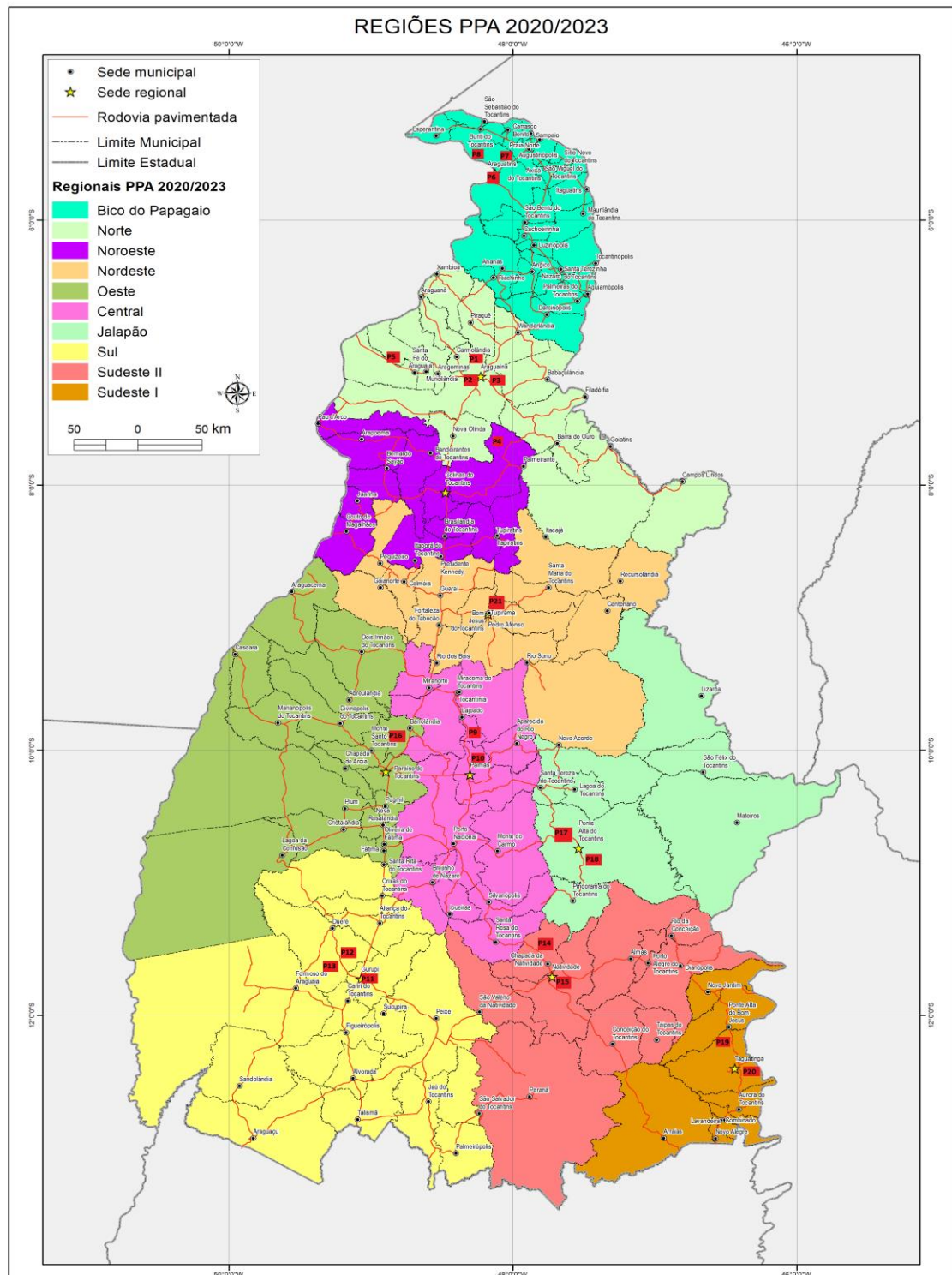
Foram selecionadas 21 propriedades em todo o estado do Tocantins distribuídas conforme a regionalização pactuada no Plano Plurianual PPA-2020/2023 realizado pela Secretaria da Fazenda e Planejamento do estado (SEFAZ, 2019).

Esta proposta metodológica do governo divide o estado em 10 regiões objetivando melhor planejamento de suas ações. São elas: Sul (Gurupi), Sudeste I (Taguatinga), Sudeste II (Natividade), Bico do Papagaio (Araguatins), Norte (Araguaína), Noroeste (Colinas do Tocantins), Nordeste (Pedro Afonso), Jalapão (São Félix do Tocantins), Oeste (Paraíso do Tocantins) e Central (Palmas). (SEFAZ, 2019).

As propriedades a serem amostradas foram identificadas por meio de busca ativa realizada através de contatos entre os próprios criadores de ovinos ao longo do estado, médicos veterinários atuantes em ovinocultura e também pela ADAPEC – Agência de Defesa Agropecuária do estado do Tocantins.

A distribuição geográfica das 21 propriedades trabalhadas de acordo com a proposta de regionalização do estado do Tocantins foi representada na Figura 01.

Figura 01: Distribuição geográfica das propriedades nas dez regiões do estado do Tocantins.



Fonte: Adaptado de SEFAZ, 2019.

Obedecendo os critérios para coleta do material nas propriedades foi realizada amostragem em todas as dez regiões do Estado.

Obteve-se dificuldade em realizar um cálculo amostral adequado, uma vez que a caracterização e quantidade de animais disponibilizada para rastreio pela ADAPEC não condizia com o número de animais disponíveis nas propriedades, logo os dados fornecidos foram flutuantes. Assim, para a escolha das propriedades, foram utilizados critérios como: quantidade de carneiros não castrados e maduros sexualmente por propriedade, disponibilidade de transporte, recursos humanos e financeiros.

Previamente ao dia da coleta foi realizado contato com cada criador combinando a data e o horário da ida da equipe em sua propriedade e, na oportunidade, passavam-se todas as recomendações necessárias.

Foram realizadas coletas de sangue, sêmen e urina de 88 (oitenta e oito) reprodutores nas 21 propriedades. As amostras foram colhidas, aleatoriamente, de ovinos aparentemente saudáveis e não saudáveis, machos, não castrados, acima de um ano e de raças variadas.

4.2. Exame clínico do trato reprodutivo

Os ovinos foram submetidos a exame clínico reprodutivo externo detalhado, sendo observados o aprumo e as características dos órgãos reprodutivos externos com os animais em estação. Foi realizada palpação dos testículos e dos epidídimos para verificar consistência, sensibilidade e simetria além da presença de lesões na bolsa escrotal, prepúcio e pênis de todos os carneiros.

Foram mensurados com auxílio de paquímetro e fita métrica dados do comprimento e largura dos testículos e dos epidídimos para avaliar volume testicular, simetria testicular e epididimária e correlacionar com os achados clínicos. Foram mensuradas circunferência escrotal (CE), comprimento do testículo direito (TCD), comprimento do testículo esquerdo (CTE), largura do testículo direito (LTD), largura do testículo esquerdo (LTE), largura da cauda do epidídimo direito (LCED) e largura da cauda do epidídimo esquerdo (LCEE).

4.3. Colheita de material e processamento das amostras

No campo, previamente às coletas todos os tubos foram identificados para cada animal de acordo com material a ser coletado e transportados em caixas isotérmicas com gelo à temperatura entre 2 e 8°C.

Foram coletados 4ml de sangue foram coletadas através de venopunção jugular, utilizando tubos tipo Vacutainer® sem anticoagulante previamente identificados. Após a coleta, já nos laboratórios de suporte da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins em Araguaína, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm para a separação do soro. Em seguida, alíquotas de soro foram depositadas assepticamente em microtubos de 1,5 ml, devidamente identificados, e acondicionados à -20°C até o momento da análise. O material foi necessário para realização de teste sorológico na etapa final do experimento.

O sêmen foi coletado através de vagina artificial e, quando necessário, com o auxílio de eletroejaculação. Amostras de aproximadamente 5 ml foram acondicionadas em tubos estéreis de fundo cônico do tipo Falcon de 15 ml e armazenadas para o transporte até o laboratório. No laboratório, com uso de fluxo laminar, foram destinadas alíquotas para isolamento bacteriano e alíquotas para diagnóstico molecular em microtubos de 1,5 ml e acondicionadas a -20°C.

Aproximadamente 10 ml de urina foram coletados e armazenadas assepticamente em frasco estéril de 15 ml e acondicionadas em temperatura de 2 a 8°C até o momento do processamento. No laboratório as amostras também foram aliqüotadas em microtubos de 1,5 ml e acondicionadas em temperatura de -20°C para realização de diagnóstico molecular. Foram retiradas alíquotas para cultivo bacteriano.

Para realização do isolamento bacteriano e aliqüotagem para o diagnóstico sorológico das amostras colhidas nas regiões Central, Oeste, Jalapão, Sul, Sudeste I e Sudeste II foi disponibilizado o Laboratório de Parasitologia e Microbiologia Humana da Universidade Federal do Tocantins em Palmas-TO.

As amostras coletadas para diagnósticos sorológico e molecular foram aliqüotadas e enviadas para o Laboratório de Patologia Molecular da UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4. Isolamento Bacteriano

Cem microlitros de amostras de sêmen e urina foram assepticamente semeadas em meio Theyer Martim modificado, com 1% de hemoglobina para isolamento bacteriológico. Para isolamento de *Brucella ovis*, foi adicionado 0,01 g de nitrofurantoína, 500 µl de nistatina e 10 ml de Vecene® para cada litro de meio. Foi utilizada uma placa para cada material (urina e sêmen) por animal e por avaliação de isolado bacteriano seguindo as exigências de crescimento para cada bactéria, totalizando seis placas por animal.

As placas de *B. ovis* foram incubadas em atmosfera úmida a 37 °C, a 5% de CO₂ e após sete dias foram avaliadas. As placas de *H. somni* foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C a 5% de CO₂ e avaliadas após dois dias. As placas de *A. seminis* foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e avaliadas também após dois dias.

A caracterização das colônias bacterianas isoladas deu-se por meio da morfologia associada à coloração de Gram, além de provas bioquímicas de catalase, oxidase, urease e indol.

Para caracterização das colônias de *A. seminis* foi levado em consideração se as colônias eram brancas, transparentes, lisas e convexas e se apresentassem os seguintes resultados: coco bacilos Gram-, catalase +, oxidase -, urease + e indol +.

Para caracterização das colônias de *Histophilus somni* foram avaliados os seguintes critérios: colônias acinzentadas, lisas e convexas sendo coco bacilos Gram -, catalase +, oxidase -, urease + e indol +.

No caso de *Brucella ovis*, foram confirmadas as colônias que apresentaram coloração branca-leitosa e eram arredondadas, lisas e convexas e foram caracterizadas como coco bacilos Gram – cujos testes bioquímicos revelaram que estas colônias eram catalase +, urease + e indol –.

4.5. Esfregaço de sêmen

Alíquotas (1 µL) de sêmen de cada animal foram coletadas para realização do esfregaço com auxílio de lâminas de vidro e foram coradas com panótico rápido com o objetivo de avaliar a presença de células inflamatórias.

O infiltrado inflamatório foi classificado como - (ausente), + (discreta - até 5 células por campo), ++ (moderada - de seis a 15 células por campo), e +++ (intensa - acima de 15 células por campo) (CARVALHO JR. et al, 2012).

4.6. ELISA indireto

O diagnóstico sorológico para detecção de *B. ovis* foi feito por meio do teste imunoenzimático (ELISA) indireto de acordo com a técnica adaptada de Barrouin-Melo et al., (2007). Foram testados dois antígenos: o antígeno bruto de *B. ovis* e a proteína periplasmática recombinante Bp26r de acordo com técnica adaptada de Barrouin-Melo et al., 2007.

4.6.1. Elisa indireto com extrato bruto de *Brucella ovis*

Para o ELISA (*B. ovis*), foi realizada a diluição dos soros e a sensibilização das placas. Para isso, foram diluídos 250 ng do antígeno em 100 µL de tampão carbonato de acordo com a sua concentração onde foram pipetados 100 µL dessa solução em cada poço. Depois dos soros diluídos em solução de PBS-BSA 2,5% a 1:250, as placas foram incubadas a 4°C até o momento do uso.

Para bloqueio e adição do anticorpo primário, previamente foi preparada a solução bloqueio (PBS-BSA 5%). Em seguida foram efetuadas três lavagens das placas com solução de lavagem (PBS-Tween-20 a 0,05%) e então pipetados 200 µL de PBS-BSA5% em cada poço, ficando então a placa incubada em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, toda a solução das placas foi retirada e foram adicionados 100 µL dos soros diluídos nos poços e sendo incubado logo em seguida por uma hora a 37°C. Após esse procedimento a placa foi lavada três vezes novamente com a solução de lavagem (PBS-Tween-20 a 0,05%).

Em seguida são diluídos os anticorpos secundários em PBS-BSA 2,5% nas proporções 1:2500 para ovino e adicionados 100 µL do anticorpo secundário diluído nos poços e a placa foi então incubada a 37°C por mais uma hora.

Após a incubação, a placa foi lavada novamente com a solução de lavagem por três vezes e foram adicionados 100 µL da solução reveladora em cada poço. A placa foi então incubada a 37°C ao abrigo de luz durante cinco minutos.

A reação foi interrompida adicionando 50 µL de H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) 4 M. Então, realizada a leitura no leitor de ELISA a 492 nm.

4.6.2. Elisa indireto com proteína periplasmática recombinante Bp26r

Para realização do ELISA com BP26r foi utilizada a concentração de 500 ng de proteína recombinante purificada diluídos em tampão carbonato - bicarbonato pH 9,6 contendo 0,015 M de carbonato de sódio, 0,35 M de bicarbonato de sódio. Assim, foram aplicados 100 µL por poço de BoP59r ou BP26r diluída e incubada a 4°C por 18 horas.

Após essa incubação, a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de PBST (PBS com 0,05% de tween 20) por poço. Em seguida, foram aplicados 200 µL de PBST contendo 5% de leite em pó desnatado e a placa incubada por 1 hora a 25°C, seguida de duas lavagens com 200 µL de PBST.

Após as lavagens, 100 µL dos soros a serem testados diluídos em PBSTL1% (PBST com 1% de leite em pó desnatado) foram aplicados e a placa incubada por 1 hora a 25°C.

O soro de um carneiro negativo por IDGA, PCR e isolamento bacteriano de amostras de urina e de um carneiro positivo nessas três provas foram testados em duplicata, nas diluições 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640.

Ao final do período de incubação foram feitas três lavagens com PBST. Em seguida, 100 µL de IgG de coelho anti-ovino conjugado com peroxidase, na diluição 1:2000 em PBSTL1%, foram adicionados a placa incubada a 37°C por 1 hora.

Três novas lavagens usando 200 µL de PBST 0,05% foram realizadas.

Ao final dessa etapa, foram aplicados 100 µL da solução contendo 0,5 mg/mL de OPD (*o*-Phenylenediamine) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5 (0,1 M ácido cítrico anidro, 0,2 M fosfato de sódio e peróxido de hidrogênio PA 130 volumes), seguido de incubação por 10

minutos a 25°C. Após este período, a reação foi interrompida com 40 µL de ácido sulfúrico 4 M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA MR-96A Microplate Reader a 492 nm.

Em todos os testes foram utilizados soros sabidamente positivos e negativos como controles de reação.

A fórmula e interpretação dos resultados foram baseados no preconizado por Barrouin-Melo et al., 2007 onde a amostra foi considerada negativa para valores menores que 0,220; a amostra foi considerada inconclusiva, quando o valor ficou entre 0,220 e 0,263 e acima de 0,263 a amostra foi considerada positiva para *B. ovis*.

4.7. Análise Estatística

As frequências de detecção de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* por isolamento bacteriológico foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando-se o software estatístico GraphPad Prism versão 8.3.1, considerando diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. (GrapPad, 2019).

O ponto de corte do ensaio imunoenzimático (ELISA) foi calculado pela soma entre o valor da média das repetições do controle negativo e duas vezes o valor do desvio padrão deste controle. Os resultados obtidos pelo ELISAI para os dois antígenos testando as 88 amostras de soro de ovinos, testadas previamente por isolamento bacteriano foram tratados no *software* GraphPad Prism versão 8.3.1.

O grau de concordância entre os testes foi determinado pelo índice Kappa (K) e os valores com intervalos de confiança de 95% interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss: 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, boa; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito.

4.8 Dados éticos da pesquisa

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso Animais da Universidade Federal do Tocantins (CEUA-UFT) sob o protocolo nº 23101.005639/2016-14.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Exame clínico do aparelho reprodutor

No exame clínico foram identificados seis diferentes tipos de patologias em 14,77% (13/88) dos animais avaliados. Além disso, foi observado aumento de sensibilidade à palpação na cauda do epidídimo em um dos treze animais (bilateralmente).

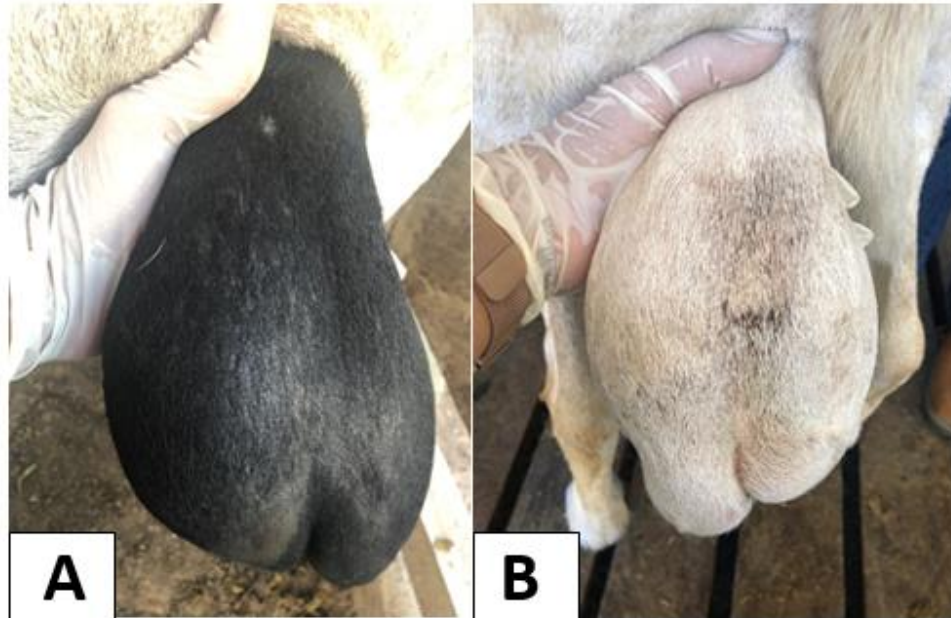
A Tabela 1 caracteriza as lesões e informa a quantidade de animais acometidos respectivamente.

Tabela 1: Alterações macroscópicas identificadas no exame clínico de carneiros no estado do Tocantins.

Patologias	Quantidade de carneiros afetados	%
Assimetria epididimária	03	23,08
Assimetria testicular	02	15,38
Dermatite em bolsa escrotal	01	7,69
Aumento de volume no epidídimo esquerdo (cauda circular e firme à palpação (sugestivo de granuloma)	05	38,47
Edema de bolsa escrotal (sugestivo de orquite)	01	7,69
Postite	01	7,69
Total de alterações	13	100

A Figura 2 (A) e (B) ilustra uma das principais alterações que foram encontradas em campo.

Figura 2: Alteração macroscópica identificada ao exame clínico em dois carneiros no estado do Tocantins. (A) Assimetria epididimária moderada - aumento de volume da bolsa escrotal por edema (sugestivo de orquite). (B) Assimetria epididimária intensa - aumento de volume da cauda do epidídimo esquerdo.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Nárez et al. (1999) estabeleceram um diagnóstico clínico em seus estudos através de observação direta e palpação. No estudo, observaram que 9,0% (10/111) dos animais apresentaram aumento no tamanho dos testículos e epidídimo aproximadamente duas vezes o normal, apresentando uma consistência dura e a presença de aderências em túnicas vaginais, associadas à presença desses agentes. Costa (2007) fez avaliação patológica das principais alterações em testículos e epidídimos de ovinos no estado do Piauí e constatou que 64,1% (34/53) dos carneiros avaliados apresentaram alterações em testículo e/ou epidídimo. Eickstein (2016), ao exame clínico, observou que 16,9% (14/83) dos reprodutores avaliados no estudo apresentaram alteração característica de epididimite. Dentre eles, 6,0% (5/83) apresentaram assimetria testicular e 4,8% (4/83) apresentaram assimetria epididimária.

A tabela 02 aponta o resultado da mensuração dos testículos e epidídimos dos carneiros avaliados.

Tabela 2. Média e desvio padrão, em *cm*, de mensuração de circunferência escrotal, dos epidídimos e dos testículos de carneiros no estado do Tocantins.

Medidas em cm pela fita métrica e paquímetro						
CE	CTD	CTE	LTD	LTE	LCED	LCEE
31,5 ± 3,18	9,2 ± 1,33	9,2 ± 1,4	5,9 ± 0,87	6,1 ± 0,76	2,8 ± 0,55	2,7 ± 0,58

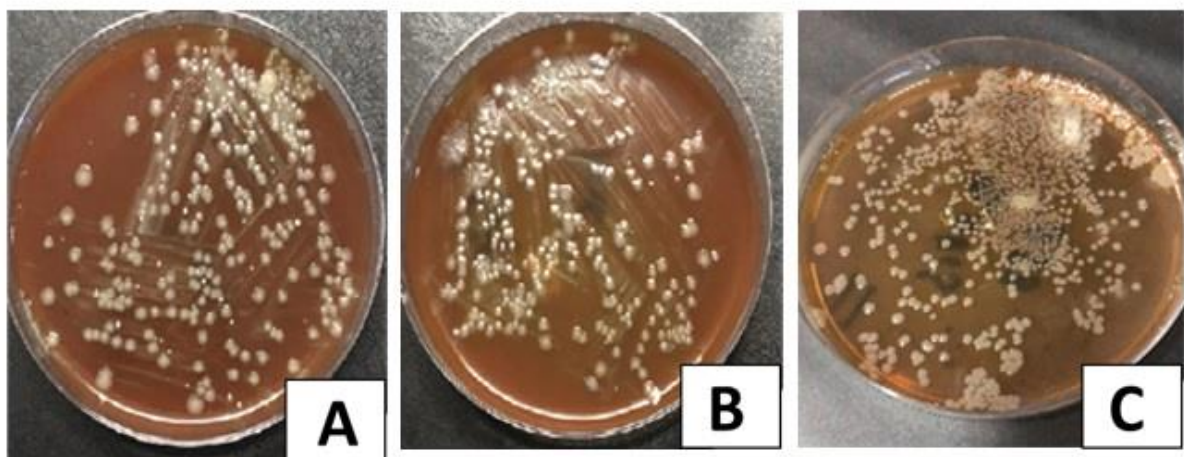
Circunferência Escrotal (CE), Comprimento Testículo Direito (CTD), Comprimento Testículo Esquerdo (CTE), Largura Testículo Direito (CTD), Largura Testículo Esquerdo (LTE), Largura da Cauda do Epidídimo Direito (LCED) e Largura da Cauda do Epidídimo Esquerdo (LCEE).

Comparando, os valores das mensurações dos testículos e dos epidídimos dos reprodutores desse estudo com os do estudo de Carvalho Júnior et al. (2010) constatou-se que as medidas estão equivalentes ao grupo com mais de 150 dias de infecção, podendo então servir de referência para a incubação dos agentes no rebanho.

5.2. Isolamento Bacteriano

A Figura 3 ilustra as morfologias das colônias isoladas de *Actinobacillus seminis* (A), *Histophilus somni* (B) e *Brucella ovis* (C) respectivamente.

Figura 3. Morfologia de colônias bacterianas isoladas do sêmen e urina de ovinos - (A) colônias de *Actinobacillus semini* isoladas de urina, (B) colônias de *Histophilus somni* isoladas da urina e (C) colônias de *Brucella ovis* isoladas de urina.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

As colônias brancas, transparentes, lisas e convexas foram tipificadas como de *Actinobacillus seminis* (Figura 4A). Estas foram caracterizadas como coco bacilos Gram-, catalase +, oxidase -, urease + e indol +.

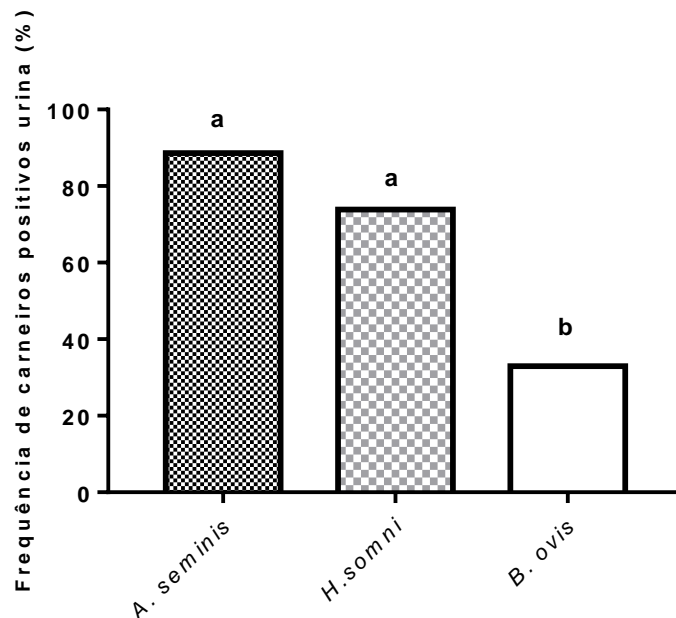
As colônias acinzentadas, lisas e convexas foram caracterizadas como *Histophilus somni* (Figura 4B) sendo coco bacilos Gram -, catalase +, oxidase -, urease + e indol +.

As colônias que apresentaram coloração branca-leitosa e eram arredondadas, lisas e convexas foram caracterizadas como *B. ovis* (Figura 4C) e foram caracterizadas como coco bacilos Gram – cujos testes bioquímicos revelaram que estas colônias eram catalase +, urease + e indol –.

Das amostras de urina que foram semeadas observou-se que 88,63 % (78/88) foram positivas para *A. seminis*, 73,86% (65/88) foram positivas para *H. somni* e 32,95% (29/88) foram positivas para *B. ovis* (Figura 4).

Além disso, 69,31% (61/88) dos animais foram considerados positivos para pelo menos dois agentes e 23,86% (21/88) foram positivos para os três agentes simultaneamente nas amostras de urina.

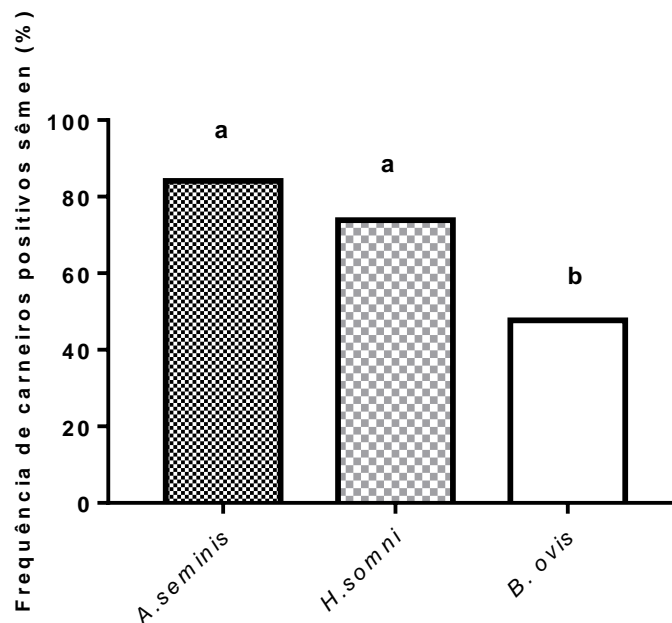
Figura 4: Frequência de detecção de *Actinobacillus.seminis*, *Histophilus somni*, e *Brucella ovis* por isolamento bacteriológico de amostras de urina (eixo Y) de reprodutores ovinos no estado do Tocantins. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P \leq 0,05$).



Das amostras de sêmen que foram semeadas, 84,09% (74/88) foram positivas para *A. seminis*, 73,86% (65/88) foram positivas para *H. somni* e 47,72% (42/88) foram positivas para *B. ovis* (Figura 5).

Concomitantemente, 69,31% (61/88) dos animais foram positivos para pelo menos dois agentes e 37,5% (33/88) foram positivos para os três agentes nos isolados de sêmen simultaneamente.

Figura 5. Frequência de detecção de *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, e *Brucella ovis* por isolamento bacteriológico de amostras de sêmen (eixo Y) de reprodutores ovinos no estado do Tocantins. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P \leq 0,05$).



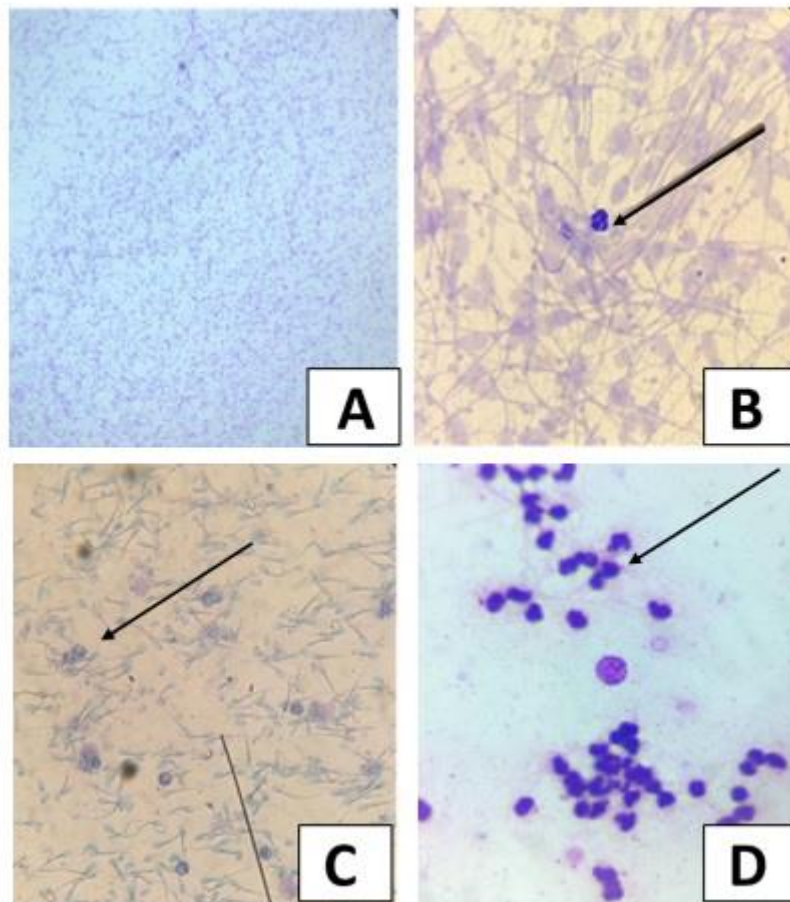
Observou-se maior frequência de isolados de *A. seminis* nas amostras de urina (88,63%), porém os isolados de *H. somni* não apresentaram diferença entre os tipos de amostras (73,86%). Os isolados de *B. ovis* foram mais frequentemente encontrados no sêmen (47,78%) em uma frequência muito semelhante à encontrada por Blobel et al. (1972). Estes resultados foram semelhantes aos apresentados por Silva et al. (2013), Xavier et al. (2010) em estudo de infecção experimental com *B. ovis* e Moustacas (2013) com *A. seminis*, *H. somni* e *B. ovis*, uma vez que a urina demonstrou ter maior sensibilidade no isolamento bacteriano dos três agentes. Também foi compatível com a prevalência apontada por Eicksten (2016) confirmando as amostras de sêmen como de escolha para diagnóstico de *B. ovis* por isolamento bacteriano.

Contudo, foi identificada diferença estatística em relação à presença dos isolados entre si, tanto nas amostras de urina quanto nas amostras de sêmen evidenciando a eficácia dos testes para o isolamento bacteriano de *A. seminis*, *H. somni* e *B. ovis* tanto para amostras de urina como para amostras de sêmen conforme evidenciado no estudo de Moustacas et al. (2013).

5.3. Esfregaço de sêmen

A Figura 6 ilustra diferentes tipos de ejaculados conforme quantificação de células inflamatórias.

Figura 6. Esfregaços de sêmen de ovinos com ausência de células inflamatórias, 10x (A) e presenças discreta (B), Moderada (C) e Intensa (D) de células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos. Coloração por panótico rápido, 40 X.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2020.

Foi constatada presença de células inflamatórias em 54,54% (48/88) das amostras avaliadas, sugerindo, portanto, infecção. Destas, em 85,41% (41/48) predominaram

neutrófilos, em 56,25% (27/48) linfócitos, em 41,66% (20/48) neutrófilos e linfócitos indicando baixa qualidade espermática nestes reprodutores.

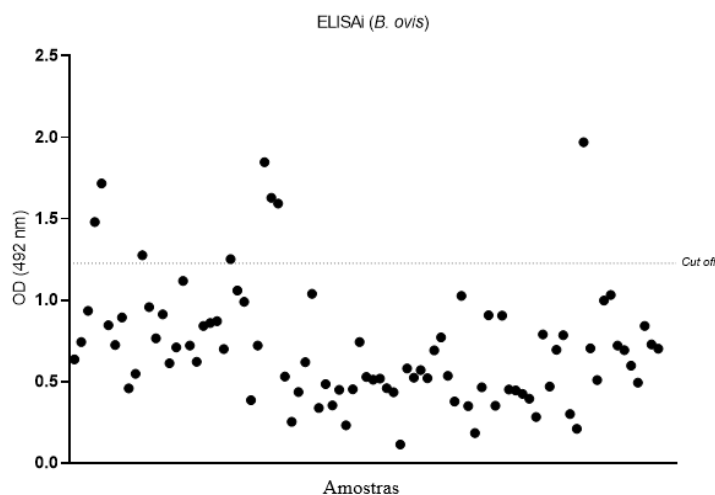
Segundo Carvalho Jr. et al. (2012) a presença dessas células está diretamente relacionada à ocorrência de epididimite infecciosa ovina no rebanho avaliado. Este mesmo estudo respalda o presente trabalho, quando afirma que a presença de células inflamatórias nos ejaculados dos carneiros assintomáticos ao exame clínico indica que a avaliação de leucócitos no ejaculado pode ser um método de rastreamento de possíveis carneiros portadores de doenças infecciosas no sistema genital, entre eles, a epididimite.

Comparando com os resultados do estudo de Einckstein (2016) constatou-se que a alta frequência de animais positivos para *A. seminis*, concomitantemente à alta ocorrência de infiltrado inflamatórios no sêmen desses animais, indica, portanto, a importância destes agentes como oportunistas nos rebanhos avaliados e são suficientes para confirmar a ocorrência da epididimite infecciosa ovina no estado do Tocantins associadas a esses agentes. Bezerra et al. (2012) confirmaram o diagnóstico de orquite e epididimite por *Actinobacillus seminis* através da associação dos achados clínico-patológicos, isolamento e identificação da bactéria.

5.4. ELISA indireto com extrato bruto de *Brucella ovis*

As amostras reativas na técnica de ELISAI (*B. ovis*) estão representadas na figura a seguir:

Figura 7. – Diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* a partir de 88 amostras de soro de ovinos submetidos ao ELISAI (*Brucella ovis*) no estado do Tocantins. Gráfico de dispersão dos valores de absorvância a 492 nm. A linha pontilhada representa o ponto de corte e os pontos representam a média das repetições. O ponto de corte foi de 1,2253 com média de 0,60075 e desvio padrão de 0,31232.

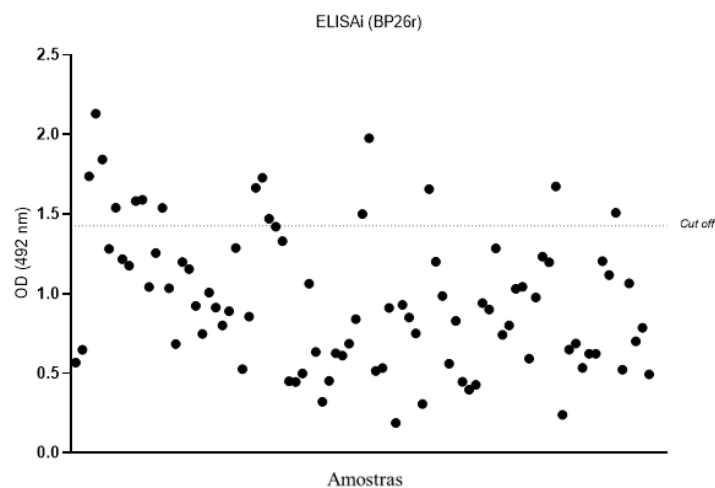


Na técnica de Elisa indireto (*B. ovis*) foram reativas para *B. ovis* 9,09% (8/88) amostras.

5.5 ELISA indireto com proteína periplasmática recombinante Bp26r

As amostras reativas na técnica de ELISAI (BP26r) estão representadas na figura a seguir:

Figura 8. Diagnóstico de infecção por *Brucella ovis* a partir de 88 amostras de soro de ovinos submetidos ao ELISAI (BP26r) no estado do Tocantins. Gráfico de dispersão dos valores de absorvância a 492 nm. A linha pontilhada representa o ponto de corte e os pontos representam a média das repetições. o ponto de corte foi de 1,40374 com média e desvio padrão de 0,86766 e 0,27869 respectivamente.



Observou-se uma baixa soropositividade nas amostras avaliadas pelas duas técnicas de Elisa indireto utilizadas, sendo de 9,09% para Elisa com extrato bruto de *B. ovis* e 17,04% para Elisa com BP26r. Os dois testes de ELISA apresentaram um índice de concordância significativo entre eles ($K= 0,35$) não havendo significância estatística entre as demais técnicas utilizadas.

Batista et al. (2011) identificou uma baixa soropositividade de *B. ovis* em carneiros naturalmente infectados no Ceará de apenas 7,81%. Burgess (2018) afirma ainda que a presença desses organismos no sêmen é um indicador confiável da presença de infecção por *B. ovis*, sendo que a falha na detecção de organismos é de pouca importância, levando em consideração o caráter intermitente da infecção nos reprodutores.

Sabe-se que os tipos de antígenos usados nos testes sorológicos podem interferir na resposta imune (FRANÇA, 2014). Portanto, correlacionar a sorologia à confirmação do isolamento do agente ou por PCR e a melhoria na qualidade do (s) antígeno (s) utilizados se faz necessário (ALVES et al, 2017). Walker et al. (1986) e Carvalho Jr et al. (2010) evidenciaram que os ensaios bacteriológicos e sorológicos demonstraram a infecção por *B. ovis* em 79,5% dos carneiros adultos com lesões no epidídimo, sendo que *A. seminis* e *H. somni* foram os dois agentes mais frequentemente isolados do organismo de carneiros com lesões no epidídimo.

As técnicas de exame sorológico só foram empregadas para diagnóstico de *B. ovis*, pois de acordo com Gomes, et al. (2001) os exames sorológicos para diagnóstico de *A. seminis* e *H. somni* não demonstraram resultados satisfatórios (GOMES, et al., 2001).

Testes moleculares, por serem mais sensíveis, são indicados para se confirmar a infecção pelos três agentes. Carvalho Júnior et al. (2013) afirma que a PCR é um método eficiente e que apesar de não ser utilizado como rotina, tem grande valor para complementar a cultura bacteriana, que é a técnica mais utilizada para o diagnóstico do agente causador da epididimite clínica. Moustacas et al. (2013) comprovou que o PCR multiplex é eficaz tanto pela sua sensibilidade como pelo fato de possibilitar a detecção simultânea de *A. seminis*, *H. somni* e *B. ovis*. Estes resultados nos dão suporte para realizar o diagnóstico da epididimite infecciosa ovina a campo.

5.6 Associação entre os diagnósticos

Constatou-se que 16,66% (13/78) dos animais positivos para *A. seminis* nas amostras de urina tiveram lesões macroscópicas no aparelho reprodutor. Nas amostras de sêmen esse número foi de 14,86% (11/74). Observou-se que todos os carneiros com lesão (13/13) foram positivos para *A. seminis* no isolamento bacteriano das amostras de urina e 84,61% (11/13) nas amostras de sêmen. Os trabalhos de Gomes et al. (2001); Gregory et al. (2009); Bezerra et al. (2012) dão respaldo ao nosso trabalho quando demonstram o diagnóstico de *A. seminis* como principal agente causador da epididimite através da associação entre essas técnicas.

76,92% (10/13) de todos os animais com lesões macroscópicas foram positivos para *B. ovis* no isolamento bacteriano nas amostras de urina assim como nas amostras de sêmen. Esse resultado foi semelhante ao de Carvalho Júnior et al. (2012) que infectaram nove carneiros com esse mesmo agente experimentalmente resultando em alterações macroscópicas compatíveis com epididimite em 66,7% dos carneiros do estudo realizado em Minas Gerais.

Comparando os resultados dos esfregaços com a bacteriologia de sêmen e de urina para os três agentes observou-se que 87,5% (42/88) dos ejaculados com presença de células inflamatórias foram considerados positivos para *A. seminis* no isolamento na urina e 83,33% (40/48) foram considerados positivos no isolamento no sêmen.

Comparando com os isolados de *H. somni* verificou-se também que 75% (36/48) dos ejaculados com presença de células inflamatórias foram positivos nas amostras de urina e 68,75% (33/48) nas amostras de sêmen.

A alta frequência de animais positivos para *A. seminis* e para *H. somni* associados à ocorrência de infiltrado inflamatório nesses animais, indica a importância destes agentes como oportunistas nos rebanhos avaliados (EICKSTEIN, 2016).

A frequência de animais que eliminaram *Actinobacillus seminis* e de *Histophilus somni* no sêmen e na urina foi maior do que a de *Brucella ovis* uma vez que são considerados agentes oportunistas, porém a associação entre os métodos diagnósticos possibilitou a relação desses agentes com a epididimite ovina.

Tratando-se de *Brucella ovis*, observou-se que 41,66% (20/48) dos ejaculados com presença de células inflamatórias tiveram presença de isolados desta bactéria nas amostras de urina e 52,38% (22/48) nas amostras de sêmen. Carvalho Júnior et al., (2012) concluíram que a pesquisa de células inflamatórias no ejaculado, é uma importante ferramenta para o rastreamento dos processos infecciosos que acometem o sistema reprodutivo em ovinos, devendo ser utilizada rotineiramente nas avaliações andrológicas desses animais. Sendo assim, a presença de isolados de *B. ovis* neste estudo, está diretamente relacionada com a alta prevalência da presença dessas células no ejaculado dos carneiros avaliados.

Comparando-se a técnica de Elisa indireto (*B. ovis*) com os demais testes, constatou-se que das 9,09% (8/88) amostras de soro dos carneiros que foram reativas, 12,5% (1/8) foram consideradas positivas no isolamento de urina e 62,5% (5/8) no isolamento da bactéria no sêmen. Essa mesma amostra que foi reativa foi compatível com os isolados de urina e de sêmen de *B. ovis* e, além disso, apresentou moderada quantidade de células inflamatórias (neutrófilos) no esfregaço.

No caso do Teste de Elisa indireto (Bp26r) 20% (3/15) das amostras reativas foram compatíveis com os isolados de *B. ovis* na urina e 46,66% (7/15) com os isolados no sêmen. O estudo de França (2014) comprovou que a técnica de Elisa indireto (Bp26r) mostrou eficiência para diferenciar os ovinos soronegativos dos soropositivos.

Observou-se que 60% (3/5) das amostras que foram reativas foram compatíveis ao isolamento bacteriológico de sêmen, porém sem a presença de célula inflamatórias.

Das cinco amostras reativas, três apresentaram infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos.

Nenhum dos animais com soros reativos para ELISAI (*B. ovis*) apresentou alterações macroscópicas no exame clínico.

Além disso, observou-se que 20% (3/15) das amostras reativas no ELISAI (BP26r) foram compatíveis com os isolados de *B. ovis* tanto na urina como no sêmen onde todas apresentaram infiltrado inflamatório neutrofílico. Um destes animais apresentou ainda, aumento de volume na cauda do epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação. Essa associação entre a sorologia e a confirmação do isolamento do agente é fundamentada no estudo de Alves et al., (2017) possibilitando, portanto, que o diagnóstico seja de maior confiabilidade.

Em relação às alterações macroscópicas 13,33% (2/15) dos animais que apresentaram ELISAI (BP26r) reativos, apresentaram lesões compatíveis com epididimite no exame clínico. Relacionando os mesmos animais com a quantidade de lâminas com presença de infiltrado inflamatório, esse número corresponde a 66,66% (10/15) predominantemente neutrofílico.

Houve simultaneidade de soropositividade para os dois testes em 5,68% (5/88) das amostras avaliadas.

É importante mencionar que os dois animais ilustrados na Figura 2 (A e B) foram considerados positivos para os três agentes tanto na bacteriologia de sêmen como na de urina, e, além disso, no animal da figura 2B foram identificadas células inflamatórias em grau moderado na análise do esfregaço de sêmen e sendo considerado positivo no ELISAI (BP26r).

Nárez et al. (1999) obtiveram 100% de positividade da doença no rebanho avaliado, diferindo dos nossos resultados, porém, observaram uma soropositividade de 9,0% (10/111) para *B. ovis* através do Elisa indireto, sendo menor do que os resultados obtidos no presente estudo para ambas as técnicas de Elisa indireto.

Pela análise comparativa dos métodos de diagnóstico é possível, portanto, associar a presença de *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* e *Brucella ovis* à doença em quantidade considerável do rebanho ovino avaliado.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a detectar, através de isolamento bacteriano, colônias de *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* e *Brucella ovis* no sêmen e urina de ovinos no estado do Tocantins, além de tornar possível a comparação com a soropositividade, avaliação clínica do aparelho reprodutor e eliminação de células inflamatórias no sêmen desses mesmos animais, confirmando, portanto, o diagnóstico de epididimite infecciosa ovina na região.

Os resultados do presente trabalho servem de ferramenta para adoção de medidas de prevenção e controle da epididimite infecciosa ovina no estado do Tocantins.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; FACCIOLI, A. Y.; VECHI, J. L. A.; ALVES, C.; SANTOS, F. A. Considerações sobre o diagnóstico sorológico da brucelose ovina no Brasil - Uma revisão. *Rev. Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. V.11. n.3 (2017).

ANTUNES, J. M. A. P. Perfil da expressão gênica induzida pela infecção experimental por *Brucella ovis* em tecidos reprodutivos e linfóides ovinos. 2012. 99 f. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu – SP, 2012.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de detecção e identificação de bactérias de importância médica – Brasília, Mod V, 2004.

AZEVEDO, S. S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L.; CLEMENTINO, .I.J.; BATISTA, C.S.A.; AZEVEDO,A.D. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Agropecuária Técnica**, Areia, v.25, n.2, p. 45-50, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M.; POESTER, F. P.; RIBEIRO, M. B.; ALCÂNTARA, A. C.; AGUIAR, P. H. P.; NASCIMENTO, I. L.; SCHAES, R. E.; NASCIMENTO, R. M.; FREIRE, S. M. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using na antigen obtained from wild *Brucella canis*. **Res. Vet. Science**. (2007), doi:10.1016/j.rvsc.2007.02.006.

BATISTA, H.M.F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B. Ocorrência de ovinos soropositivos para *Brucella ovis* nos rebanhos do Estado do Ceará. In: **Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual Vale do Acaraú**, 6, 2011, Sobral, CE. Resumos. Sobral: 2011. 8f.

BEZERRA, M. J. G., SANTOS, A. S., CRUZ, J. A. O., KUNG, E. S., Sa S.G., JABOUR, F. F, BRITO, M. F. e MOTA, R. A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(5): 369-373; 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 102 de 17 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Plano Nacional de Vigilância e Controle da Epididimite Ovina_ *Brucella ovis*. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de dezembro 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/legislacao>. Acesso em: 14/05/2020.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. – Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009.

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

CARVALHO JÚNIOR, C.A., Xavier M. N; Costa, L. F.; SILVEIRA, S. S.; SANT'ANNA, F. M.; BORGES, A. M.; GOUVEIA, A. M. G.; SANTOS, R. L.. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina [Infectious agents that can cause infertility in rams]. **Rev Bras Reprod Anim** 2010, 34:160–167.

CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Rumin. Res.**, v.102, p.213-222, 2012.

CARVALHO, T. P. Patogenicidade de cepas de *Brucella ovis* isoladas de campo e avaliação da proteção induzida pela cepa vicinal encapsulada *B. ovis* $\Delta abcBA$ em camundongos. 2019. 35 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

COSTA, L. F.; PESSOA, M. S.; GUIMARÃES, L. B.; FARIA, A. K. S.; MORÃO, R. P.; MOL, J. P. S.; GARCIA, L. N. N.; ALMEIDA, A. C.; GOUVEIA, A.M.G.; SILVA, M. X.; PAIXÃO, T. A. e SANTOS, R. L. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. **BMC Res Notes** (2016) 9:190. DOI 10.1186/s13104-016-1998-2.

COSTA, F.L.A.; SILVA, S.M.M.S.; NASCIMENTO, E.F. Avaliação patológica de testículos e epidídimos de ovinos deslanados da região semi-árida do Estado do Piauí. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1110-1116, 2007.

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

COLETO, Z. F.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R.A.; GUERRA, M.M.P; SIMPLÍCIO, K.M.M.G.; CÂMARA, D.R.; SOARES, R.P.T.; PORTO, W.J.N; CINTRA JÚNIOR, J.E.;

FASTINO, M.G.; SOUZA, A.F.; BERTO, R.S. Ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em ovinos do estado de Pernambuco e sua participação em distúrbios reprodutivos nesta espécie (estudos preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, 2003.

ECKSTEIN, Camila. Dissertação de Mestrado (Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop, Janeiro de 2016, 55f. **Caracterização da ovinocultura e ocorrência de epididimite infecciosa em ovinos da região médio norte de Mato Grosso**. Orientador: Prof. Dr. Luciano Bastos Lopes. Coorientadores: Prof. Dr. Artur Kanadani Campos e Prof. Dr. Renato de Lima Santos.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. **Intranet**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censoagropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>>. Acesso em: 05 set 2020.

FOSTER, R.A. & LADS P.W. 2007. Male genital system, p.590-591. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), **Phatology of Domestic Animals**, 5th ed. Vol. 3, Saunders Elsevier, Totonto.

FRANÇA, S.A., MOL, J.P.S., COSTA, E.A., SILVA, A.P.C., XAVIER, M.N., TSOLIS, R.M., REIS, J.K.P., PAIXÃO, T.A. e SANTOS, R.L. (2014). Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66(6), 1695-1702, 2014.

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

GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M. Experimental *Brucella ovis* infections in pregnant ewes. **Vet. Record**, v.144, p.555-558, 1999.

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

IBGE. Censo Agropecuário 2018. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Disponível em:<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em 08 de setembro de 2020.

ISHIZUKA, M. M.; LEITE, L. O.; DINIZ, O. Epidemiologia e profilaxia da epididimite infecciosa ovina (Brucelose ovina), 2005. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/programas/getdocdoc.php?idform=3>>. Acesso em: 10/09/2020.

MARINHO, M. e MATHIAS, L. A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 2-3, p. 45-48, 1996. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/64775>>.

MARQUES, A.P. Caracterização soropidemiológica da infecção por vírus Maedi-visna e *Brucella ovis* em ovinos do estado de Minas Gerais. 2006. 74f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MARTINS, N. E. X.; ALMEIDA, J. D. M.; GIANOCCARO, M. S.; SOUSA, M. G.; MATHIAS, L. A.; ALMEIDA, K. S. Prevalência de anticorpos anti-*Brucella ovis* e anti-*Brucella abortus* em ovinos do município de Colinas, Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 42 (2): 147-160. abr.-jun. 2013.

MOUSTACAS, V. S., SILVA, T. M. A.; COSTA, L. F.; XAVIER, M. N.; CARVALHO, C. A. J.; COSTA, É. 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**, 9:51, 2013.

MOUSTACAS, V.S.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A.; COSTA, L. F.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Real-time PCR for detection of *Brucella ovis* and *Histophilus somni* in ovine urine and sêmen. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.6, p.1751-1755, 2015.

NÁREZ, G. M.; APARICIO, E. D.; ALVARÉZ, J. F. M.; ROMERO, F. A.; GUEMES, F. S. Epididimitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico. **Veterinaria Mexico**, vol. 30, núm. 4, octubre-diciembre, 1999, pp. 329-336.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf>. Acesso em 05 de setembro de 2020.

OLIVEIRA, P. A. M. Anticorpos anti- *Brucella ovis* em ovinos no Estado do Paraná e comparação das técnicas de diagnóstico IDGA e ELISA (**Dissertação**). Arapongas: UNOPAR, 38p. 2016.

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

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RAMOS, A.A.; MIES FILHO, A.; SCHENK, J.A.P; VASCONCELOS, L.D.; PRADO, O.T.; FERNANDES, J.C.T.; BLOBEL, H. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p. 211-213, 1966.

SALABERRY, S. R.S. Epidemiologia das principais doenças infecciosas de ovinos do município de Uberlândia, MG. 2010, 72 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

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

SANTOS, F. A., JÚNIOR, F. G., KIM, P. C. P., ARAÚJO, J. L., AZEVEDO, S. S., MOTA, R. A., DANTAS, A. F. M. ALVES, C.J. Achados microbiológicos, moleculares e histopatológicos em pequenos ruminantes experimentalmente infectados com *Actinobacillus seminis*. **Pesq. Vet. Bras.** 37 (7): 686-690, julho 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017000700006.

SANTOS, F. A. Aspectos epidemiológicos da epididimite em pequenos ruminantes: isolamento, caracterização molecular e diagnóstico diferencial. 2017. 109 f. **Tese** (Doutorado em Ciência e Saúde Animal). Centro de Saúde e Tecnologia Rural: Universidade Federal de Campina Grande – PB. Campina Grande – PB, 2017.

SCARCELLI, E., GENOVEZ, M; E., CARDOSO, M; V., CAMPOS, F. R., MIYASHIRO, S., PIATTI, R. M. TE IXEIRA, S. R., STEFANO, E., OKUDA, L. H., PITUCO, E. M. Abortamento e morte embrionária em receptoras bovinas por *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*). **Acta Sci Vet**, v.32, p.59-64, 2004.

SCHAFER, I.; VAZ, A.; RAMELLA, J.; COUTINHO, G. Prevalência de carneiros reagentes à prova de imunodifusão em gel para *Brucella ovis*, no município Lages-SC. **A hora veterinária**, Porto Alegre, v.17, n. 99, p.60-61, 1997.

SEFAZ - SECRETARIA DA FAZENDA E DO PLANEJAMENTO DO ESTADO DO TOCANTINS. **Plano Plurianual, PPA-2020/2023: Consultas Públicas - SEFAZ/TO.** Palmas, Tocantins, 2019. Disponível em: < <http://ppa.seplan.to.gov.br/site>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

SILVA, A.P. C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet. Microbiol.*, v.167, p 546-553, 2013.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M.; et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, p.789–97, 2015a.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ($\Delta abcBA$) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One*, v.10, e0136865, 2015b

SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, J.S. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.13, n.1, p. 51-54, 2003.

SORIO, A. **Diagnóstico da oferta e demanda de ovinos e caprinos para processamento de carne, pele e leite na região central do Tocantins.** Governo do Estado do Tocantins, 2018. 240p.

WALKER R.L., LEAMASTER B. R., STELLFLUG J. N., BIBERSTEIN, E. L. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J Am Vet Med Assoc*, v.188, p.393-396, 1986.

XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A. *et al.* Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.

APÊNDICES

Tabela 1: Distribuição das amostras por propriedade, segundo região do estado do Tocantins.

REGIÃO	ID PROPRIEDADES	ID ANIMAIS
Norte	P1	A1 e A2
	P2	A3 a A7
	P3	A8 a A18
Noroeste	P4	A19 a A33
Norte	P5	A34 a A42
Bico do Papagaio	P6	A43 a A44
	P7	A45 a A47
	P8	A48 a A50
Central	P9	A51
	P10	A52
		A53 a A54
		A55 a A58
Sul	P11	A59 a A64
	P12	A65 a A68
	P13	A69 a A71
Sudeste	P14	A72 a A75
	P15	A76 e A77
Oeste	P16	A78
Jalapão	P17	A79 a A81
	P18	A82 e A83
Sudeste I	P19	A84
	P20	A85 e A86
Nordeste	P21	A87
		A88

*Onde P: propriedade e *n*: número da propriedade (P*n*); A: animal e *n*: número do animal.

Quadro 01. Valores em *cm* de mensuração de circunferência escrotal em ovinos, dos epidídimos e dos testículos de 87 carneiros no estado do Tocantins. Circunferência Escrotal (CE), Comprimento Testículo Direito (CTD), Comprimento Testículo Esquerdo (CTE), Largura Testículo Direito (LTD), Largura Testículo Esquerdo (LTE), Largura Cauda do Epidídimo Direito (CCED), Largura Cauda Epidídimo Esquerdo (CCEE) e suas respectivas lesões macroscópicas identificadas no exame clínico.

ANIMAL	CE	CTD	CTE	LTD	LTE	CCED	CCEE	LESÕES
A1	30,0	8,5	8,4	5,5	5,0	2,0	2,9	
A2	25,0	7,8	7,3	4,0	5,0	1,9	1,5	
A3	33,0	8,6	7,7	6,0	5,7	2,4	2,5	
A4	36,0	9,0	9,0	6,0	7,0	2,5	2,8	
A5	34,0	9,0	9,3	7,5	6,9	2,8	2,6	
A6	29,0	6,8	7,0	6,4	5,7	2,4	2,4	
A7	30,0	8,3	9,0	5,5	5,8	2,4	2,2	
A8	33,0	9,5	8,5	6,9	6,5	2,5	2,5	
A9	34,0	8,5	9,0	6,6	7,0	3,0	3,2	
A10	34,5	8,6	8,0	6,1	6,6	2,0	2,1	
A11	31,0	9,0	9,0	7,0	7,0	3,0	2,8	
A12	34,0	9,2	9,4	6,5	6,4	3,3	3,0	
A13	35,0	9,0	9,0	6,6	6,7	3,5	3,4	
A14	28,0	8,0	8,5	5,7	5,5	3,1	2,9	
A15	32,0	6,2	6,0	9,0	9,3	2,9	2,8	
A16	31,5	9,5	9,7	5,5	6,0	3,0	2,9	
A17	30,0	7,9	8,3	5,4	6,5	2,5	2,5	
A18	29,0	9,0	9,5	5,5	5,7	2,5	2,3	
A19	31,0	7,5	8,0	5,9	5,9	2,2	2,0	
A20	30,0	8,3	8,2	6,1	5,9	2,7	2,9	
A21	32,0	9,5	9,0	5,8	6,3	2,3	2,0	
A22	32,0	9,5	10,0	6,0	6,2	2,1	2,1	
A23	30,0	8,4	8,0	5,5	6,3	2,5	2,4	
A24	31,0	8,2	8,0	5,4	5,9	2,4	2,5	
A25	29,0	7,5	6,8	4,5	5,4	2,0	2,0	
A26	33,0	8,1	9,7	6,3	6,6	3,0	2,5	
A27	27,0	6,8	7,0	5,0	4,5	2,5	2,5	
A28	28,0	7,5	7,5	4,4	5,0	2,5	2,7	
A29	30,0	8,7	8,5	5,0	5,2	1,9	2,0	

A30	29,5	8,5	8,5	4,5	5,3	1,9	2,0	
A31	26,0	7,3	7,8	4,5	5,0	2,0	2,2	
A32	24,5	6,7	5,4	4,2	4,5	2,0	2,1	
A33	25,0	7,3	8,0	4,7	4,5	2,0	2,5	
A34	30,0	9,0	8,4	5,6	5,5	2,1	2,1	
A35	29,0	9,0	9,5	6,5	6,3	2,6	2,4	
A36	33,5	11,0	10,5	6,0	6,4	3,0	2,7	Aumento de volume no epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação
A37	24,0	7,4	7,6	4,3	5,1	1,8	1,6	Aumento de volume no epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação
A38	32,0	9,4	9,8	6,0	5,9	2,5	2,6	
A39	28,0	10,1	9,8	6,1	6,7	2,4	1,9	Assimetria epididimária
A40	32,0	8,9	8,6	5,5	5,6	2,4	2,4	
A41	35,0	10,8	10,4	7,3	6,2	3,8	3,2	Assimetria testicular
A42	36,0	7,0	7,2	4,5	4,9	2,5	2,0	
A43	33,0	11,9	11,2	6,5	7,0	3,5	3,2	
A44	34,5	8,9	9,9	7,0	6,5	3,0	3,2	
A45	31,0	7,1	9,3	4,8	6,2	2,3	3,1	Aumento de volume no epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação
A46	33,0	9,5	9,5	6,0	6,3	2,7	2,5	
A47	31,0	9,7	9,4	6,6	6,6	2,5	2,8	
A48	33,0	11,1	12,1	7,0	6,4	2,8	2,5	
A49	34,0	11,5	11,2	7,2	6,7	3,1	3,2	Assimetria testicular
A50	30,0	9,1	8,4	6,0	5,8	2,5	2,5	Dermatite bolsa escrotal
A51	32,0	10,0	9,3	5,4	6,1	3,1	3,1	Aumento de volume no epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação (orquite)
A52	31,6	11,0	10,6	6,0	6,6	3,6	3,4	
A53	30,0	9,0	9,7	5,8	6,3	3,3	3,7	Lesão inflamatória no prepúcio (postite)
A54	27,6	8,6	8,4	5,0	5,6	2,6	2,1	
A55	27,0	9,0	8,7	5,0	5,6	2,0	2,3	Lesão prepúcio, aumento de volume no epidídimo de aspecto arredondado e firme à palpação
A56	34,3	10,3	11,0	6,0	7,2	3,4	2,9	Assimetria epididimária
A57	29,0	8,6	8,6	5,0	5,4	2,7	2,5	
A58	30,6	9,7	10,0	5,7	6,2	3,0	2,7	
A59	30,0	10,4	10,5	5,3	6,3	3,2	3,1	

A60	27,0	9,6	9,3	5,4	5,6	2,6	2,8	
A61	30,4	10,9	11,2	6,0	6,3	3,0	2,9	
A62	30,0	9,9	9,4	6,4	6,5	3,0	2,7	
A63	27,2	7,6	7,4	5,4	5,6	3,6	2,7	
A64	32,0	10,6	11,3	6,2	6,3	3,1	2,6	
A65	35,0	10,5	11,0	5,5	6,5	2,5	2,6	
A66	38,0	11,6	11,4	7,6	7,4	2,7	3,0	
A67	33,0	10,7	11,5	6,4	6,5	3,5	3,5	
A68	36,0	11,0	11,1	7,5	6,5	3,4	3,5	
A69	35,5	9,2	10,2	6,0	7,0	3,4	3,2	
A70	32,5	11,0	10,4	5,9	5,9	2,9	3,0	
A71	31,2	10,2	9,9	5,8	6,1	2,9	2,5	
A72	36,0	11,0	11,4	7,5	7,0	3,6	4,0	
A73	39,0	12,0	12,1	6,9	7,2	3,0	3,4	
A74	31,6	9,6	10,0	6,0	7,0	2,6	2,9	
A75	35,6	9,0	8,3	7,0	7,0	3,6	3,6	
A76	35,0	9,6	9,4	6,5	6,0	3,0	4,0	
A77	33,0	11,5	12,0	7,5	7,0	4,4	4,4	
A78	35,0	9,3	9,3	6,7	6,5	3,4	3,5	
A79	33,0	10,4	10,7	5,9	5,9	2,6	2,6	
A80	31,0	9,0	9,2	5,4	6,0	2,9	3,0	Orquite (dor e edema)
A81	32,3	9,3	8,9	5,9	5,6	3,9	3,3	Assimetria epididimária
A82	34,0	10,6	10,0	6,1	6,3	3,2	3,4	
A83	34,0	9,0	10,0	5,6	6,0	3,0	1,3	
A84	37,0	10,6	10,6	6,4	6,4	3,6	3,6	
A85	28,0	8,6	8,9	5,6	5,6	3,3	3,0	
A86	24,0	7,4	6,2	5,0	5,0	3,0	3,1	
A87	33,6	11,0	10,7	6,7	7,0	3,7	3,9	
A88	31,5	9,4	8,9	5,9	6,2	3,2	3,0	

Tabela 2. Células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) no esfregaço de sêmen de 88 carneiros no estado do Tocantins. Avaliação semi-quantitativa no sêmen (-) ausente, (+) discreto, (++) moderado, (+++) intenso.

Animais	Esfregaço de sêmen		Animais	Esfregaço de sêmen		Animais	Esfregaço de sêmen	
	Neutrófilos	Linfócitos		Neutrófilos	Linfócitos		Neutrófilos	Linfócitos
A1	-	-	A31	++	++	A61	+	-
A2	++	++	A32	-	-	A62	-	-
A3	+	+	A33	-	-	A63	++	-
A4	+	+	A34	-	-	A64	-	-
A5	+	+	A35	-	-	A65	+++	-
A6	-	++	A36	-	-	A66	+++	+
A7	+	+	A37	-	-	A67	++	+
A8	+	+	A38	-	-	A68	++	+
A9	-	+	A39	-	-	A69	++	+
A10	-	-	A40	-	-	A70	++	+
A11	+	-	A41	-	+	A71	+	-
A12	+++	+	A42	++	++	A72	-	-
A13	-	-	A43	-	+	A73	+++	++
A14	++	+	A44	-	-	A74	-	-
A15	-	-	A45	++	-	A75	+	+
A16	-	-	A46	-	-	A76	+	+
A17	-	+	A47	-	-	A77	-	-
A18	+	+	A48	+	-	A78	-	+
A19	+	-	A49	+	-	A79	+++	-
A20	-	-	A50	-	-	A80	+++	-
A21	-	+	A51	+++	-	A81	+	+
A22	-	-	A52	-	-	A82	-	-
A23	-	-	A53	+++	-	A83	-	-
A24	-	-	A54	-	-	A84	-	-
A25	+++	-	A55	+++	-	A85	+	-
A26	-	+	A56	++	-	A86	-	-
A27	-	-	A57	-	-	A87	+	-
A28	+	-	A58	-	-	A88	-	-
A29	-	-	A59	++	-			
A30	++	-	A60	-	-			

Tabela 3: Comparação entre isolamento bacteriano nas amostras de urina e presença e escore de células inflamatórias (neutrófilos) no esfregaço de sêmen de carneiros no estado do Tocantins.

ANIMAIS	Isolamento Bacteriano Urina			Esfregaço de sêmen	ANIMAIS	Isolamento Bacteriano Urina			Esfregaço de sêmen
	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>			<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>	
A1	NEG	NEG	NEG	0	A45	POS	POS	NEG	(++)
A2	NEG	POS	NEG	(++)	A46	POS	POS	NEG	0
A3	POS	POS	NEG	(+)	A47	POS	POS	NEG	0
A4	POS	POS	NEG	(+)	A48	POS	POS	NEG	(+)
A5	NEG	NEG	NEG	(+)	A49	POS	POS	POS	(+)
A6	NEG	NEG	NEG	(++)	A50	POS	POS	NEG	0
A7	POS	POS	NEG	(+)	A51	POS	POS	POS	(+++)
A8	POS	POS	NEG	(+)	A52	NEG	NEG	POS	0
A9	NEG	POS	NEG	0	A53	POS	NEG	POS	(+++)
A10	POS	POS	NEG	0	A54	POS	POS	NEG	0
A11	POS	POS	NEG	(+)	A55	POS	POS	POS	(+++)
A12	POS	POS	NEG	(+++)	A56	POS	POS	POS	(++)
A13	POS	POS	NEG	0	A57	POS	POS	NEG	0
A14	POS	POS	NEG	(++)	A58	NEG	POS	NEG	0
A15	POS	POS	NEG	0	A59	NEG	NEG	POS	(++)
A16	POS	NEG	NEG	0	A60	POS	POS	NEG	0
A17	POS	POS	NEG	(+)	A61	NEG	POS	POS	(+)
A18	POS	POS	NEG	(+)	A62	POS	POS	NEG	0
A19	POS	NEG	NEG	(+)	A63	POS	POS	POS	(++)
A20	POS	NEG	NEG	0	A64	POS	POS	POS	0
A21	POS	POS	NEG	(+)	A65	POS	POS	NEG	(+++)
A22	POS	POS	NEG	0	A66	POS	POS	POS	(+++)
A23	POS	POS	POS	0	A67	POS	POS	NEG	(++)
A24	POS	POS	NEG	0	A68	POS	POS	NEG	(++)
A25	POS	POS	NEG	(+++)	A69	POS	NEG	NEG	(++)
A26	POS	POS	NEG	(+)	A70	POS	POS	NEG	(++)
A27	POS	POS	NEG	0	A71	POS	POS	POS	(+)
A28	POS	POS	POS	(+)	A72	POS	NEG	NEG	0
A29	POS	NEG	NEG	0	A73	POS	NEG	POS	(+++)
A30	POS	POS	POS	(++)	A74	POS	POS	NEG	0
A31	POS	POS	NEG	(++)	A75	POS	POS	NEG	(+)
A32	POS	POS	NEG	0	A76	POS	NEG	POS	(+)
A33	POS	POS	POS	0	A77	POS	NEG	NEG	0
A34	POS	POS	POS	0	A78	POS	NEG	NEG	0
A35	POS	POS	NEG	0	A79	POS	POS	POS	(+++)
A36	POS	POS	POS	0	A80	POS	POS	POS	(+++)
A37	POS	POS	POS	0	A81	POS	NEG	POS	(+)
A38	POS	POS	NEG	0	A82	NEG	NEG	NEG	0
A39	POS	POS	POS	0	A83	POS	NEG	NEG	0
A40	POS	POS	POS	0	A84	POS	NEG	NEG	0
A41	POS	POS	NEG	(+)	A85	POS	NEG	NEG	(+)
A42	POS	POS	POS	(++)	A86	POS	POS	NEG	0
A43	POS	NEG	POS	(+)	A87	POS	POS	POS	(+)
A44	POS	POS	NEG	0	A88	POS	NEG	NEG	0

Tabela 4: Comparação entre os resultados do isolamento bacteriano nas amostras de sêmen e esfregaço de sêmen de carneiros no estado do Tocantins.

ANIMAIS	Isolamento Bacteriano Sêmen			Esfregaço de sêmen	Isolamento Bacteriano Sêmen				Esfregaço de sêmen
	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>		ANIMAIS	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>	<i>B. ovis</i>	
A1	NEG	NEG	NEG	0	A45	POS	POS	NEG	(++)
A2	NEG	NEG	NEG	(++)	A46	POS	POS	POS	0
A3	NEG	NEG	NEG	(+)	A47	POS	POS	POS	0
A4	POS	NEG	POS	(+)	A48	POS	POS	NEG	(+)
A5	POS	NEG	NEG	(+)	A49	POS	POS	POS	(+)
A6	POS	POS	NEG	(++)	A50	POS	POS	NEG	0
A7	POS	POS	NEG	(+)	A51	POS	POS	POS	(+++)
A8	POS	POS	NEG	(+)	A52	POS	POS	POS	0
A9	POS	NEG	NEG	0	A53	POS	POS	POS	(+++)
A10	NEG	NEG	NEG	0	A54	POS	POS	POS	0
A11	POS	NEG	POS	(+)	A55	NEG	POS	POS	(+++)
A12	POS	POS	POS	(+++)	A56	POS	POS	POS	(++)
A13	NEG	POS	NEG	0	A57	POS	POS	NEG	0
A14	POS	POS	NEG	(++)	A58	POS	NEG	POS	0
A15	POS	POS	NEG	0	A59	POS	NEG	POS	(++)
A16	NEG	NEG	NEG	0	A60	POS	POS	NEG	0
A17	NEG	POS	NEG	(+)	A61	POS	POS	POS	(+)
A18	POS	POS	NEG	(+)	A62	POS	POS	NEG	0
A19	POS	POS	POS	(+)	A63	POS	POS	POS	0
A20	POS	POS	POS	0	A64	POS	NEG	POS	(++)
A21	NEG	NEG	NEG	(+)	A65	POS	POS	POS	0
A22	POS	POS	POS	0	A66	POS	POS	POS	(+++)
A23	POS	POS	POS	0	A67	POS	POS	NEG	(++)
A24	POS	POS	POS	0	A68	POS	POS	NEG	(++)
A25	POS	POS	POS	(+++)	A69	POS	POS	POS	(++)
A26	POS	NEG	NEG	(+)	A70	POS	POS	NEG	(++)
A27	POS	POS	NEG	0	A71	POS	POS	NEG	(+)
A28	POS	POS	POS	(+)	A72	POS	POS	POS	0
A29	POS	POS	NEG	0	A73	POS	POS	NEG	(+++)
A30	POS	POS	POS	(++)	A74	POS	POS	POS	0
A31	POS	POS	NEG	(++)	A75	POS	POS	POS	(+)
A32	NEG	NEG	NEG	0	A76	POS	POS	NEG	(+)
A33	POS	POS	NEG	0	A77	POS	POS	POS	0
A34	POS	POS	POS	0	A78	POS	NEG	NEG	0
A35	POS	POS	NEG	0	A79	NEG	NEG	NEG	(+++)
A36	POS	POS	POS	0	A80	POS	NEG	POS	(+++)
A37	POS	POS	POS	0	A81	NEG	NEG	NEG	(+)
A38	POS	POS	POS	0	A82	POS	POS	NEG	0
A39	POS	POS	POS	0	A83	POS	NEG	NEG	0
A40	POS	POS	NEG	0	A84	POS	POS	NEG	0
A41	POS	POS	POS	(+)	A85	POS	POS	NEG	(+)
A42	POS	POS	POS	(++)	A86	POS	NEG	NEG	0
A43	NEG	NEG	POS	(+)	A87	POS	NEG	NEG	(+)
A44	NEG	POS	POS	0	A88	POS	POS	NEG	0

Tabela 5: Comparação entre os resultados do ELISAi com extrato bruto de *B. ovis* e do ELISAi com BP26r.

ANIMAIS	ELISAi (<i>B. ovis</i>)	ANIMAIS	ELISAi (<i>B. ovis</i>)	ANIMAIS	ELISAi (BP26r)	ANIMAIS	ELISAi (BP26r)
A1	-	A45	-	A1	-	A45	+
A2	-	A46	-	A2	-	A46	+
A3	-	A47	-	A3	+	A47	-
A4	+	A48	-	A4	+	A48	-
A5	+	A49	-	A5	+	A49	-
A6	-	A50	-	A6	-	A50	-
A7	-	A51	-	A7	+	A51	-
A8	-	A52	-	A8	-	A52	-
A9	-	A53	-	A9	-	A53	-
A10	-	A54	-	A10	+	A54	-
A11	+	A55	-	A11	+	A55	+
A12	-	A56	-	A12	-	A56	-
A13	-	A57	-	A13	-	A57	-
A14	-	A58	-	A14	+	A58	-
A15	-	A59	-	A15	-	A59	-
A16	-	A60	-	A16	-	A60	-
A17	-	A61	-	A17	-	A61	-
A18	-	A62	-	A18	-	A62	-
A19	-	A63	-	A19	-	A63	-
A20	-	A64	-	A20	-	A64	-
A21	-	A65	-	A21	-	A65	-
A22	-	A66	-	A22	-	A66	-
A23	-	A67	-	A23	-	A67	-
A24	+	A68	-	A24	-	A68	-
A25	-	A69	-	A25	-	A69	-
A26	-	A70	-	A26	-	A70	-
A27	-	A71	-	A27	-	A71	-
A28	-	A72	-	A28	+	A72	-
A29	+	A73	-	A29	+	A73	-
A30	+	A74	-	A30	+	A74	+
A31	-	A75	-	A31	-	A75	-
A32	+	A76	-	A32	-	A76	-
A33	-	A77	+	A33	-	A77	-
A34	-	A78	-	A34	-	A78	-
A35	-	A79	-	A35	-	A79	-
A36	-	A80	-	A36	-	A80	-
A37	-	A81	-	A37	-	A81	-
A38	-	A82	-	A38	-	A82	-
A39	-	A83	-	A39	-	A83	+
A40	-	A84	-	A40	-	A84	-
A41	-	A85	-	A41	-	A85	-
A42	-	A86	-	A42	-	A86	-
A43	-	A87	-	A43	-	A87	-
A44	-	A88	-	A44	-	A88	-

Tabela 6 – Número de criações de ovinos positivos por isolamento bacteriano de urina e de sêmen , ELISAi (*B. ovis*) e ELISAi (BP26r) para *B. ovis* nas 10 regiões no estado do Tocantins, Brasil.

Regiões	Propriedades com ovinos positivos (%)			
	Isolamento Bacteriano (urina)	Isolamento Bacteriano (sêmen)	ELISAi (<i>B. ovis</i>)	ELISAi (BP26r)
Bico do Papagaio	66,6 (2/3)	100,0 (3/3)	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)
Norte	25,0 (1/4)	75% (3/4)	50,0 (2/4)	50,0 (2/4)
Noroeste	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)
Nordeste	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)
Oeste	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)
Central	100,0 (2/2)	100,0 (2/2)	0,0 (0/2)	50,0 (1/2)
Jalapão	0,0 (0/2)	0,0 (0/2)	0,0 (0/2)	50,0 (1/2)
Sul	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	0,0 (0/3)	33,3 (1/3)
Sudeste II	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	0,0 (0/2)
Sudeste I	50,0 (1/2)	0,0 (0/2)	0,0 (0/2)	0,0 (0/2)
Total	57,14 (12/21)	66,6 (14/21)	19,04 (4/21)	33,3 (7/21)

Quadro 02: Resultados gerais obtidos nas técnicas de Isolamento bacteriano, esfregaço de sêmen, exame clínico do trato reprodutor e testes sorológicos de amostras de 88 carneiros distribuídos nas 21 propriedades nas dez regiões do estado do Tocantins.

ID P	REGIÕES	MUNICÍPIO	ID A	ISOLAMENTO BACTERIANO						ESFREGAÇO		EXAME CLÍNICO	ELISA	
				UA	UH	UB	SA	SH	SB	N	L		LESÕES	ELISAI (B. ovis)
P1	NORTE	ARAGUAÍNA	A1	-	-	-	-	-	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A2	-	+	-	-	-	-	(++)	(++)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P2		ARAGUAÍNA	A3	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A4	+	+	-	+	-	+	(+)	(+)	SEM LESÃO	REATIVO	REATIVO
			A5	-	-	-	+	-	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	REATIVO	REATIVO
			A6	-	-	-	+	+	-	0	(++)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A7	+	+	-	+	+	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A8	+	+	-	+	+	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P3		ARAGUAÍNA	A9	-	+	-	+	-	-	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A10	+	+	-	-	-	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A11	+	+	-	+	-	+	(+)	0	SEM LESÃO	REATIVO	REATIVO
			A12	+	+	-	+	+	+	(+++)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A13	+	+	-	-	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A14	+	+	-	+	+	-	(++)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A15	+	+	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A16	+	-	-	-	-	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A17	+	+	-	-	+	-	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A18	+	+	-	+	+	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P4	NOROESTE	PALMEIRANTE	A19	+	-	-	+	+	+	(+)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO

ID P: Identificação propriedade; ID A: Identificação amostra; UA: isolados de *A. seminis* na urina, UH: isolados de *H. somni* na urina, UB: isolados de *B. ovis* na urina; SA: isolados de *A. seminis* no sêmen; SH: isolados de *H. somni* no sêmen; SB: isolados de *B. ovis* no sêmen; N: neutrófilos; L: linfócitos; Elisai (B. ovis): Elisa indireto com extrato bruto de *B. ovis*; Elisai Bp26r: Elisa indireto com a proteína recombinante Bp26r.

			A20	+	-	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A21	+	+	-	-	-	-	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A22	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A23	+	+	+	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A24	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	REATIVO	NÃO REATIVO
			A25	+	+	-	+	+	+	(+++)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A26	+	+	-	+	-	-	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A27	+	+	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A28	+	+	+	+	+	+	(+)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A29	+	-	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	REATIVO	REATIVO
			A30	+	+	+	+	+	+	(++)	0	SEM LESÃO	REATIVO	REATIVO
			A31	+	+	-	+	+	-	(++)	(++)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A32	+	+	-	-	-	-	0	0	SEM LESÃO	REATIVO	NÃO REATIVO
			A33	+	+	+	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P5	NORTE	SANTA FÉ DO ARAGUAIA	A34	+	+	+	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A35	+	+	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A36	+	+	+	+	+	+	0	0	AUMENTO DE VOLUME NO EPIDÍDIMO DE ASPECTO ARREDONDADO E FIRME À PALPAÇÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A37	+	+	+	+	+	+	0	0	AUMENTO DE VOLUME NO EPIDÍDIMO DE ASPECTO ARREDONDADO E FIRME À PALPAÇÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A38	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO

ID P: Identificação propriedade; ID A: Identificação amostra; UA: isolados de *A. seminis* na urina, UH: isolados de *H. somni* na urina, UB: isolados de *B. ovis* na urina; SA: isolados de *A. seminis* no sêmen; SH: isolados de *H. somni* no sêmen; SB: isolados de *B. ovis* no sêmen; N: neutrófilos; L: linfócitos; Elisai (B.ovis): Elisa indireto com extrato bruto de *B. ovis*; Elisai Bp26r: Elisa indireto com a proteína recombinante Bp26r.

			A39	+	+	+	+	+	+	0	0	ASSIMETRIA EPIDIDIMÁRIA	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A40	+	+	+	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A41	+	+	-	+	+	+	0	(+)	ASSIMETRIA TESTICULAR	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A42	+	+	+	+	+	+	(++)	(++)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P6		ARAGUATINS	A43	+	-	+	-	-	+	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A44	+	+	-	-	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P7	BICO DO PAPAGAIO	ARAGUATINS	A45	+	+	-	+	+	-	(++)	0	AUMENTO DE VOLUME NO EPIDÍDIMO DE ASPECTO ARREDONDADO E FIRME À PALPAÇÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A46	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
			A47	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
P8		ARAGUATINS	A48	+	+	-	+	+	-	(+)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A49	+	+	+	+	+	+	(+)	0	ASSIMETRIA TESTICULAR	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A50	+	+	-	+	+	-	0	0	DERMATITE BOLSA ESCROTAL	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P9	CENTRAL	LAJEADO	A51	+	+	+	+	+	+	(+++)	0	AUMENTO DE VOLUME NO EPIDÍDIMO DE ASPECTO ARREDONDADO E FIRME À PALPAÇÃO (ORQUITE)	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A52	-	-	+	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A53	+	-	+	+	+	+	(+++)	0	LESÃO INFLAMATORIA NO PREPÚCIO (+TITE)	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
			A54	+	+	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO

ID P: Identificação propriedade; ID A: Identificação amostra; UA: isolados de *A. seminis* na urina, UH: isolados de *H. somni* na urina, UB: isolados de *B. ovis* na urina; SA: isolados de *A. seminis* no sêmen; SH: isolados de *H. somni* no sêmen; SB: isolados de *B. ovis* no sêmen; N: neutrófilos; L: linfócitos; Elisai (B.ovis): Elisa indireto com extrato bruto de *B. ovis*; Elisai Bp26r: Elisa indireto com a proteína recombinante Bp26r.

											LESÃO PREPÚCIO + AUMENTO DE VOLUME NO EPIDÍDIMO DE ASPECTO ARREDONDADO E FIRME À PALPAÇÃO	NÃO REATIVO	REATIVO	
											ASSIMETRIA EPIDIDIMÁRIA	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
											SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
											SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P10		PALMAS										NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P11		GURUPI										NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P12	SUL	DUERÉ										NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
P13		DUERÉ										NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO
												SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO

ID P: Identificação propriedade; ID A: Identificação amostra; UA: isolados de *A. seminis* na urina, UH: isolados de *H. somni* na urina, UB: isolados de *B. ovis* na urina; SA: isolados de *A. seminis* no sêmen; SH: isolados de *H. somni* no sêmen; SB: isolados de *B. ovis* no sêmen; N: neutrófilos; L: linfócitos; Elisai (B.ovis): Elisa indireto com extrato bruto de *B. ovis*; Elisai Bp26r: Elisa indireto com a proteína recombinante Bp26r.

														REATIVO	REATIVO
P14	SUDESTE II	CHAPADA DA NATIVIDADE	A76	+	-	+	+	+	-	(+)	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
			A77	+	-	-	+	+	+	0	0	SEM LESÃO	REATIVO	NÃO REATIVO	
P15		NATIVIDADE	A78	+	-	-	+	-	-	0	(+)	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P16	OESTE	BARROLÂNDIA	A79	+	+	+	-	-	-	(+++)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
			A80	+	+	+	+	-	+	(+++)	0	ORQUITE (DOR E EDEMA)	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
			A81	+	-	+	-	-	-	(+)	(+)	ASSIMETRIA EPIDIDIMÁRIA	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P17	JALAPÃO	PONTE ALTA	A82	-	-	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
			A83	+	-	-	+	-	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	REATIVO	
P18		PONTE ALTA	A84	+	-	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P19	SUDESTE I	TAGUATINGA	A85	+	-	-	+	+	-	(+)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
			A86	+	+	-	+	-	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P20		TAGUATINGA	A87	+	+	+	+	-	-	(+)	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	
P21	NORDESTE	TUPIRAMA	A88	+	-	-	+	+	-	0	0	SEM LESÃO	NÃO REATIVO	NÃO REATIVO	

ID P: Identificação propriedade; ID A: Identificação amostra; UA: isolados de *A. seminis* na urina, UH: isolados de *H. somni* na urina, UB: isolados de *B. ovis* na urina; SA: isolados de *A. seminis* no sêmen; SH: isolados de *H. somni* no sêmen; SB: isolados de *B. ovis* no sêmen; N: neutrófilos; L: linfócitos; Elisai (B.ovis): Elisa indireto com extrato bruto de *B. ovis*; Elisai Bp26r: Elisa indireto com a proteína recombinante Bp26r.