



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA AZEVEDO DE CARVALHO LIMA

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Chlamydophila*
spp EM OVINOS DE PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM
MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ**

Londrina
2007

BRUNA AZEVEDO DE CARVALHO LIMA

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Chlamydophila*
spp EM OVINOS DE PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM
MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina
2007

BRUNA AZEVEDO DE CARVALHO LIMA

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Chlamydophila*
spp EM OVINOS DE PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM
MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Profa. Dra. Jane Megid

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina, 11 de maio de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Leptospirose, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Área de Concentração Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1. PROPPG: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina

2. CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

AGRADECIMENTOS

À Deus, o meu profundo agradecimento por todo amor, esperança e sentido que trouxe à minha vida e por ter guiado meus passos. E por inúmeras vezes, nos momentos mais difíceis da minha vida, trouxe paz e alegria ao meu coração.

À toda minha família pela força dada, especialmente aos meus pais, Jerian e Celise, minhas irmãs Fabia e Carla, minha tia Célia e minha Vó Celina, pelo amor e apoio em minhas decisões. E gostaria de pedir desculpas pelo mau humor que tomava conta de mim algumas vezes, pelas respostas mal educadas, por eu querer ficar sozinha de vez em quando. Acho que nunca vou conseguir retribuir a altura tudo que vocês merecem. Amo todos vocês!!!

Ao meu noivo Alfredinho pela amizade, pela força dada, pelo companheirismo, por ter batalhado comigo pela minha carreira, por sempre acreditar em mim, por saber como ninguém me colocar pra cima quando não estou bem. Obrigada amor por entender minha ausência em alguns momentos e por fazer tudo parecer simples e fácil.

Ao professor Julio por ter me orientado, acreditado em mim e ter me ensinado tantas coisas.

Às professoras Dr^a. Alice Fernandes Alfieri e Dr^a. Roberta Lemos Freire, membros da banca de avaliação de qualificação, pela colaboração nesse trabalho.

Ao Jimmy Alberto pelo simples fato de estar do meu lado e pelo amor incondicional.

Ao Kledir pela amizade, pelas palavras de incentivo, e pela colaboração fundamental para a realização deste trabalho. E por ter feito tudo parecer muito divertido.

À Fran pela parceria e dedicação a este trabalho, e principalmente pela amizade que construímos.

À todo o pessoal do Laboratório de Leptospirose: Lucimara, Japa, Eleine e Valéria por toda força dada, pelas risadas no laboratório e pela amizade construída nesses anos.

Aos técnicos Luciene e "Zé da Micro" pela colaboração, amizade e paciência. Vocês me ensinaram muito!!!

A Dani Dib, Íris, Mário, Chokito, Kenio e Aline pela amizade e ajuda prestada nesse trabalho.

Aos amigos de pós-graduação Marão, Klebber, Magoo, Walfrido, Dunga, Betinha, Flora, Jú Dias, Marlise, Gi, Maurinho, Nikita, Carioca, Julian, Cláudia Boselli, Karina Keller, Ale Amude pelos apoios, conselhos, consolos e principalmente pela amizade.

Aos amigos Bibi, Mari, Luiza, Elida, Ana Marta, Maria Fernanda, Minhoca e Luciano pelo carinho e amizade durante esses anos todos aqui em Londrina.

Aos amigos Kerley e Cláudio pela amizade, carinho e apoio. Vocês foram minha família enquanto estive longe de casa.

À Dalíria pelos conselhos dados nas horas certas.

À Cinthinha por ser essa amiga maravilhosa.

À Neuza e Maria José pelas conversas, bolinhos e cafezinhos de todos os dias. Ao Sergio, Neide e Cris pela ajuda dada e pela amizade.

A todos do laboratório de genética, principalmente a professora Maria Helena Fungaro por ter emprestado o laboratório e à Mestranda Lara pelas conversas jogadas fora.

Ao carneiro Bodão, que literalmente "deu o sangue" para o meu trabalho e a todos os animais usados durante trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial Hélio (Microbiologia), Ademir (Zoonose), Zé e João (Patologia Clínica).

À todos os professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal. Aos Funcionários da PROGRAD

Aos Secretários Helenice, Valdecir e Reinaldo.

E a todos que contribuíram de maneira direta e indireta neste trabalho, muito obrigada!

**"Esperei com paciência no Senhor,
e ele se inclinou para mim, e ouviu
meu clamor." (Salmos 40,1)**

LIMA, B. A. C. **Prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em ovinos de propriedades localizadas em municípios da região de Londrina, Paraná.** 2007. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

As Bactérias da família *Chlamydiaceae* são classificadas nos gêneros *Chlamydia* e *Chlamydophila*. O primeiro contém as espécies *C. trachomatis*, *C. suis* e *C. muridarum* e o segundo as espécies *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae* e *C. caviae*. Entre as espécies do gênero *Chlamydophila* causadoras de doença da esfera reprodutiva em animais de interesse econômico, a *C. abortus* tem sido descrita em vários países, como causa de abortamento, nascimento de animais prematuros e natimortalidade. A doença causada pela *C. abortus* é conhecida como aborto enzoótico ovino, aborto enzoótico caprino e pelo aborto epizoótico bovino, causando prejuízos econômicos e problemas de saúde pública. A dificuldade em se realizar o diagnóstico da clamidofilose tanto por isolamento, por provas de biologia molecular, como por provas sorológicas, pode ser a causa da ausência de citações da *C. abortus* em ovinos, no Brasil, até a presente data. O objetivo deste trabalho foi estimar a soroprevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* em ovinos de propriedades localizadas em municípios da região de Londrina, Estado do Paraná. A prova de fixação de complemento, recomendada pela OIE, foi realizada em 267 amostras de soro sanguíneo de ovinos, provenientes de oito propriedades, sendo considerados positivos os animais que apresentaram títulos > 32. Foram detectados 19 (7,11%) animais positivos, e sete (87,50%) propriedades tiveram pelo menos um animal positivo. Nestas propriedades, foram relatados sinais clínicos de abortamento, natimortalidade, nascimento de crias fracas e repetição de cio. Dos 19 soros positivos, 17 (89,50%) apresentaram títulos de 32, um (5,30%) apresentou título de 64 e um (5,30%) apresentou título de 128. Este resultado indica a presença de anticorpos contra *Chlamydophila* nas propriedades estudadas.

Palavras -chave: Aborto enzoótico ovino. *Chlamydophila abortus*. Prevalência. Diagnóstico. Prova de fixação de complemento. Problema reprodutivo.

LIMA, B. A. C. **Prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em ovinos de propriedades localizadas em municípios da região de Londrina, Paraná.** 2007. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Bacteria from the family *Chlamydiaceae* are classified in genres *Chlamydia* and *Chlamydophila*. The former contains the species *C. trachomatis*, *C. suis* and *C. muridarum* and the latter, the species *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae* and *C. caviae*. Among the species from genre *Chlamydophila*, which are known as the causers of reproductive diseases in animals of economic interests, *C. abortus* has been described in several countries as a cause of abortion, birth of premature animals and natimortality. The disease caused by *C. abortus* is known as ovine enzootic abortion, caprine enzootic abortion and as cattle epizootic abortion, causing great economic losses and public health problems. The difficulty in reaching a diagnosis of chlamydophilosis whether by isolation, by molecular biology tests, or by serological tests can be the cause for the lack of literature on *C. abortus* in ovines in Brazil until the present date. The aim of this paper is to estimate the seroprevalence of antibodies against *Chlamydophila* in ovines from farms in cities from the region of Londrina, in the state of Parana, Brazil. The complement fixation test, recommended by OIE, was performed in 267 samples from ovine sera samples collected from eight different properties. Animals presenting titers > 32 were considered positive. From the samples analyzed, a total of 19 animals (7.11%) were considered positive, and seven properties (87.50%) had at least one animal considered positive. In these properties, clinical symptoms of abortion, natimortality, birth of weak offsprings and repetition of estrus were reported. From the 19 sera samples considered positive, 17 (89.50%) presented titers of 32, one (5.30%) presented titer of 64 and one (5.30%) presented titer of 128. This result indicates the presence of antibodies against *Chlamydophila* in the properties analyzed in this study.

Keywords: Ovine enzootic abortion. *Chlamydophila abortus*. Prevalence. Diagnosis. Complement fixation test. Reproductive problems.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	10
CHLAMYDOPHILA ABORTUS EM OVINOS	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
EPIDEMIOLOGIA.....	13
PATOGENIA.....	15
DIAGNÓSTICO	17
CONTROLE E PROFILAXIA	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA <i>Chlamydophila</i> spp EM OVINOS DE PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM MUNÍCIPIOS DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	41
ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL, SANTA MARIA.....	42

1 REVISÃO DE LITERATURA

CLAMIDOFILOSE

RESUMO

As Bactérias da família *Chlamydiaceae* são classificadas nos gêneros *Chlamydia* e *Chlamydophila*. O primeiro contém as espécies *C. trachomatis*, *C. suis* e *C. muridarum* e o segundo as espécies *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae* e *C. caviae*. Elas causam uma grande variedade de doenças em mamíferos e aves. Infecções em animais podem resultar em abortamento, infertilidade, enterite, encefalomielite, conjuntivite, artrite e doenças respiratórias, entretanto é comum a ocorrência de infecção assintomática em animais clinicamente saudáveis. Entre as espécies do gênero *Chlamydophila* causadoras de doença da esfera reprodutiva em animais de interesse econômico, a *C. abortus* tem sido descrita em vários países, como responsável pelo aborto enzoótico ovino (AEO), aborto enzoótico caprino e pelo aborto epizoótico bovino, causando prejuízos econômicos e problemas de saúde pública. Talvez pela dificuldade em se realizar o diagnóstico da doença, não há citações da *C. abortus* em ovinos, no Brasil, até a presente data. O diagnóstico da *C. abortus* pode ser realizado por cultivo em ovo embrionado, cultivo celular, imunistoquímica, detecção de DNA, provas de imunofluorescência, Elisa e prova de fixação de complemento. O Escritório Internacional de Epizootias (OIE) (2004) recomenda como uma das técnicas para a pesquisa de anticorpos contra *Chlamydophila*, a prova de fixação de complemento.

Palavras -chave: *Chlamydophila abortus*. Aborto enzoótico ovino. Diagnóstico. Sorologia. Anticorpos. Bactéria.

CHLAMYDOPHILOSIS

ABSTRACT

Bacteria from the family *Chlamydiaceae* are classified in genres *Chlamydia* and *Chlamydophila*. The former contains the species *C. trachomatis*, *C. suis* and *C. muridarum* and the latter, the species *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae* and *C. caviae*. These bacteria cause a great variety of diseases in mammals and birds. Infection in animals can result in abortion, infertility, encephalomyelitis, conjunctivitis, arthritis, and respiratory diseases. However, asymptomatic infection is also common in clinically healthy animals. Among the species from the genre *Chlamydophila*, which causes reproductive problems in animals with an economic interest, *C. abortus* has been described in several countries as the responsible for ovine enzootic abortion (OEA), caprine enzootic abortion, and also for cattle epizootic abortion, causing economic losses and public health problems. Perhaps due to the difficulty in diagnosing the disease, there is no mention of *C. abortus* in ovines in Brazil until the present date. The diagnosis of *C. abortus* can be obtained through culture in embryonic egg, cellular culture, immunohistochemical analysis, DNA detection, immunofluorescence test, Elisa and complement fixation test. The Office for International Epizooties (OIE) (2004) recommends complement fixation test as one of the techniques for the research of antibodies against *Chlamydophila*.

Keywords: *Chlamydophila abortus*. Ovine enzootic abortion. Diagnosis. Serology. Antibodies. Bacteria.

INTRODUÇÃO

Membros da família *Chlamydiaceae* são bactérias gram-negativas, cocóides e intracelulares obrigatórias (CORSARO et al, 2003). Com base principalmente na análise filogenética do gene 16s e 23s do rRNA, e nas informações fenotípicas, morfológicas e genéticas, Everett (2000) propôs a reclassificação da família *Chlamydiaceae* no gênero *Chlamydia* com as espécies *C. trachomatis*, *C. suis* e *C. muridarum* e no gênero *Chlamydophila*, com as espécies *C. abortus*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. felis* e *C. caviae*.

Bactérias da família *Chlamydiaceae* causam uma grande variedade de doenças em mamíferos e aves. Infecções em animais podem resultar em abortamento, infertilidade, enterite, encefalomielite, conjuntivite, artrite e doenças respiratórias, entretanto é comum a ocorrência de infecção assintomática em animais clinicamente sadios (EVERETT, 2000).

Nos ruminantes a infecção por *C. abortus*, anteriormente classificada como *C. psittaci* sorotipo 1, está associada, frequentemente, a casos de abortamento e nascimento de animais fracos e esporadicamente podem causar os mesmos sinais clínicos em eqüinos, coelhos, cobaias, e suínos (EVERETT, 2000). Além dos prejuízos econômicos determinados pela *C. abortus*, também foi reconhecido seu potencial zoonótico com relato da doença em mulheres grávidas (LONGBOTTON; COULTER, 2003; MEIJER et al., 2004).

Uma das manifestações mais importantes provocadas por essa bactéria é o aborto enzoótico dos ovinos (AEO) e caprinos e o aborto epizoótico bovino, (SZEREDI; BACSADI, 2002).

EPIDEMIOLOGIA

O primeiro diagnóstico do AEO foi obtido por Stamp et al. (1950) na Escócia, enquanto o isolamento de bactérias da família *Chlamydiaceae* foi obtido pela primeira vez a partir de amostra de aborto bovino por STORZ et al. (1960). No Reino Unido o AEO foi responsável por 45,00% dos abortos diagnosticado (AITKEN, 1990), entretanto na Nova Zelândia e Austrália, áreas tradicionais na ovinocultura foram descritos somente casos isolados de AEO (SEAMAN, 1985), não sendo esta enfermidade considerada problema (ORR, 1989). Na Namíbia, Espanha, Jordânia e Itália, estudos sorológicos demonstraram respectivamente 30,00%, 50,50%, 21,80% e 4,80% de animais positivos (APEL et al., 1989; MAFNAR-JAFME et al., 1998; AL-QUDAH et al., 2004; MASALA et al., 2005). Estudos realizados em rebanhos da Suíça demonstraram 19,00% de soropositividade (BOREL et al., 2004), enquanto em Taiwan soropositividade de 16,70% e 58,00% respectivamente em animais sadios e em animais com histórico de aborto foram encontrados por Wang et al. (2001).

Estudos sorológicos realizados em bovinos na Itália e na Índia demonstraram, respectivamente, 53,70% e 80,70% dos animais com anticorpos contra *Chlamydia*, enquanto em Taiwan foi detectado anticorpos contra *Chlamydia* em 51,00% de animais saudáveis e em 74,00% de animais com problemas reprodutivos (PUGLIESE et al., 1991; NANDA et al., 1992; WANG et al., 2001).

Em caprinos, estudos sorológicos realizados na Namíbia, Jordânia, Itália e Tobago demonstraram respectivamente 25,20%, 11,40%, 5,80% e 1,10% de animais com anticorpos contra *Chlamydia* (APEL et al., 1989; AL-QUDAH et al., 2004; Masala et al., 2005; BORDE et al., 2006).

No Brasil, dados sorológicos sobre a clamidofilose são praticamente inexistentes. O único levantamento sorológico em bovinos no país foi realizado por Souza et al. (2004), que detectaram 12,50% de bovinos positivos para *C. abortus*, pela prova de fixação de complemento. Freitas E Machado (1988) isolaram *C. psittaci* a partir de amostras de órgãos de bubalinos com poliserosite, abatidos e destinados ao consumo no Pará. Romjin e Liberal (1990) relataram o isolamento de *C. psittaci* a partir de amostras de pulmão de bezerros com pneumonia no Rio de Janeiro. Gomes et al. (2001) relataram pela primeira vez no Brasil, o isolamento de *C. psittaci*, provavelmente se tratando de *C. abortus*, a partir de sêmem de touros com vesiculite seminal.

A transmissão da clamidofilose pode ser vertical, através da infecção direta do feto via placenta (BUXTON et al., 1999, 2002), ou horizontal, pelo contato com o agente por via conjuntival, genital, ou pela ingestão do microrganismo, sendo esta última a forma mais importante (DeGRAVES et al., 2004).

Os animais podem se infectar em qualquer idade e em qualquer estação do ano, porém o período crítico, onde a doença se dissemina facilmente em um rebanho, é no pós parto, onde grande número de bactérias é eliminado juntamente com a placenta, feto abortado ou descarga uterina para o meio ambiente servindo como via de transmissão para outros animais e humanos contactantes (LONGBOTTON; COULTER, 2003).

Uma a duas semanas após o abortamento, a secreção vaginal cessa, e a próxima gestação do animal não está comprometida, pois dificilmente uma ovelha que abortou por AEO abortará novamente pela mesma causa (LONGBOTTON; COULTER, 2003). Contudo, se essa imunidade for incompleta, esses animais podem voltar a eliminar a *C. abortus* em suas próximas gestações (PAPP; SHEWEM, 1996a).

Evidências da transmissão venérea de *C. psittaci* foram pesquisadas por Ball et al., (1964) e Storz et al., (1968) que detectaram a presença do microrganismo em órgãos genitais de búfalos que apresentavam epididimite, orquite e vesiculite seminal. Rodolakis e Bernard, (1977) isolaram *C. psittaci* do sêmem de um cordeiro de 12 meses de idade, com infecção crônica do trato genital, nascido de ovelha inoculada experimentalmente. Papp e Shewen, (1996b) inocularam *C. psittaci* por via intravaginal em ovelhas após a monta ou durante a gestação e induziram o aborto, natimorto e nascimentos de cordeiros fracos. Entretanto, Wilsmore et al. (1984) e Appleyard et al. (1985) não detectaram infecção nem o abortamento após a inseminação de ovelhas com sêmem de carneiro infectado com *C. psittaci* ou após a cobertura de ovelhas com carneiro infectado, por via intavenosa, com *C. psittaci*. Veznik et al. (1996) utilizaram a prova de imunofluorescência para confirmar a eliminação de corpos elementares e reticulados de clamídia no sêmem de búfalos, caprinos e do homem. Kauffold et al. (2005) pesquisaram a presença de DNA clamidial no sêmem caprino, pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e encontraram 5,20% de resultados positivos em um rebanho e 24,00% no outro. Teankum et al. (2006), também trabalhando com PCR, encontraram somente 3/25 amostras de sêmem de caprinos, sendo uma delas correspondente a *C. abortus* e as outras duas a organismos "*Chlamydia-like*".

PATOGENIA

O desenvolvimento do ciclo começa com a adesão do corpo elementar (CE), forma infectante das clamídias nas membranas das células hospedeiras (JONES et al., 2000) e sua endocitose em vacúolos que, por um mecanismo ainda não conhecido, não sofrem fusão com os lisossomos, ficando protegidos pela membrana do seu vacúolo durante seu desenvolvimento (VANROMPAY et al., 1995). Uma vez na célula hospedeira, o CE sofre modificações morfológicas, aumenta de tamanho e se converte nos corpos reticulados (CR), que se replicam por fissão binária, formando uma microcolônia intracitoplasmática, chamada de inclusão clamídial (CORSARO et al., 2003). Após a replicação os CRs se reorganizam através de formas intermediárias, em novos CEs (EVERETT, 2000) que são liberados da célula hospedeira pela ruptura da célula ou pela fusão da inclusão com a membrana citoplasmática da célula, assim o ciclo recomeça com a invasão de células vizinhas (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

Estudos realizados em ovinos indicam que a infecção por *C. abortus* se estabelece primeiramente na tonsila e então é disseminada pelo sangue e linfa para outros órgãos (JONES; ANDERSON, 1988). Em animais não prenhes há uma infecção latente possivelmente em tecidos linfóides, num processo que é mediado por citocinas e interferon-gamma (IFN- γ) (ENTRICAN et al., 1998). Durante a gestação subsequente, acredita-se que por mecanismos imunomediados, a bactéria saia de seu estado de latência, e volte a se multiplicar, levando a um baixo grau de clamidodemia, que inicia a infecção da placenta (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). Por volta do 60º dia de gestação, desenvolve-se um hematoma na superfície materno-fetal do hilo de cada placentoma, mas nenhuma alteração patológica ocorre até os 90 dias de gestação. A clamidofila primeiro invade as células do epitélio coriônico de vários placentomas, onde se replica formando uma inclusão clamídial no citoplasma dessas células (BUXTON et al., 1990; NAVARRO et al., 2004). Depois de estabelecida a infecção nas células do epitélio trofoblástico do hilo de vários placentomas, a infecção se difunde para o peri-placentoma e então para a região intercotiledonária do córion, onde danos causados no epitélio como edema e inflamação resultam na coloração avermelhada e aumento da espessura das membranas da placenta, característica da doença (ENTRICAN et al., 1998; LONGBOTTOM; COULTER, 2003; NAVARRO et al., 2004).

O mecanismo específico responsável pelo aborto não está claro, mas a causa básica é a destruição do epitélio coriônico e as lesões associadas, que levam ao

enfraquecimento da integridade funcional dos placentomas e ao comprometimento da troca materno-fetal de oxigênio e nutrientes, levando a morte fetal (BUXTON et al., 1990, 2002).

Durante a infecção da placenta, ocorre alteração de prostaglandina E2, 17 β estradiol, e progesterona, podendo resultar no aparecimento de partos prematuros (KERR et al., 2005). Animais recém nascidos nascem fracos, podendo apresentar quadros respiratórios inespecíficos e de encefalite, geralmente morrendo 48 horas após o nascimento (LONGBOTTOM; COULTER, 2003), e caso sobrevivam, apresentarão infecção latente, que se manifestará, provavelmente logo na primeira gestação (PAPP; SHEWEN et al., 1996a/b).

Geralmente em um surto inicial da doença, o rebanho apresenta uma pequena taxa de aborto, porém no ano seguinte, o número de abortos, nascimentos prematuros ou nascimento de animais fracos, pode chegar a 30,00% ou mais, após isso a taxa permanece entre 5-10,00%, se os animais infectados não forem tratados (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

Ocasionalmente a placenta fica retida podendo levar ao desenvolvimento de metrite, por contaminação bacteriana secundária (WITTENBRINK et al., 1993). DeGRAVES, et al., (2004) demonstraram que novilhas infectadas com *C. abortus* diretamente no útero possuem 8,5 vezes mais chances de desenvolver infertilidade, quando comparada com animais não expostos ao agente.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da clamidífilose, pode ser realizado pelo isolamento e identificação da bactéria ou de seu material genético em abortos ou descarga vaginal e pela detecção de anticorpos por diferentes técnicas (OIE, 2004).

Entre os métodos diagnósticos usados para detecção de *C. abortus* em placenta, órgãos de fetos abortados, secreção vaginal (até 14 dias após abortamento) e sêmem estão o cultivo em ovos embrionados e cultivo celular seguido da identificação através de características de inclusão em culturas celulares (STORZ et al., 1968; BROWN; NEWMAN, 1989; GRIFFITHS et al., 1992).

Para a identificação direta do microrganismo nessas inclusões, em amostras clínicas ou em cortes de tecidos, pode ser usada a coloração citológica, teste de imunofluorescência direta, ELISA e imunistoquímica (STAMP et al, 1950; GRIMES et al., 1987; CANFIELD et al., 1991; THIELE et al., 1992).

A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido indicada para detecção de material genético da bactéria e diferenciação das espécies da família *Chlamydiaceae* (EVERETT, 2000; LAROUCAU et al., 2001).

Técnicas indiretas, que visam à detecção de anticorpos contra *C. abortus*, como ELISA, imunofluorescência indireta e prova de fixação de complemento têm sido utilizadas (OIE, 2004). São testes utilizados para triagem, principalmente em países onde existem programas de controle da doença, pois apresentam alta sensibilidade e são de fácil execução após realizada a padronização, podendo ser realizadas em um grande número de amostras concomitantemente (GOMES et al., 2001).

A imunofluorescência indireta é utilizada no diagnóstico humano de espécies de *Chlamydia* e *Chlamydophila*, mas não tem sido utilizada em medicina veterinária (BUENDIA et al., 2001; OIE, 2004).

Estudos baseados em diferentes sistemas de ELISA, com o uso de anticorpo monoclonal e fragmentos de proteínas recombinantes tendem a diminuir possíveis reações cruzadas, melhorando a especificidade do teste (SALT-MONTESSANTO et al., 1997; BUENDIA et al., 2001; LONGOBOTTOM et al., 2001).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (2004) recomenda como uma das técnicas para a pesquisa de anticorpos, a prova de fixação de complemento. Esta prova detecta anticorpos direcionados a um epítopo do antígeno lipopolissacarídico, presente

em todos os membros da família *Chlamydiaceae*, reconhecendo, portanto, anticorpos produzidos contra qualquer uma das espécies do grupo (EVERETT, 2000). Reação cruzada entre *C. abortus* e *C. pecorum*, como também com algumas bactérias gram-negativas pode dar falso positivo no teste (OIE, 2004).

CONTROLE E PROFILAXIA

Depois do abortamento, as ovelhas devem ser isoladas por até três semanas e toda a placenta ou feto abortado deve ser destruído. Além disso, deve ser realizada a desinfecção do local para prevenir a disseminação da doença entre os demais animais do rebanho (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

O AEO é frequentemente introduzido num rebanho pela aquisição de animal infectado, porém assintomático, portanto, em áreas livres da doença os animais de reposição devem ser adquiridos de rebanhos com monitoramento sorológico e conhecidamente livres da infecção por *C. abortus* (ENTRICAN et al., 2001).

Atualmente há dois tipos de vacina disponíveis comercialmente para ovinos, uma viva atenuada e outra inativada (OIE, 2004). As duas vacinas causam uma boa imunidade contra o aborto, e significativa redução da eliminação do microrganismo no momento do parto (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). Segundo a OIE (2004) estas vacinas podem ser aplicadas por via intamuscular ou subcutânea e a vacinação deve ser realizada sempre antes da monta natural ou inseminação artificial.

Essa revisão tem como objetivo apresentar características do agente e métodos diagnósticos utilizados, para um melhor conhecimento do AEO no Brasil, pois a ausência de dados sobre a doença no país pode subestimar sua real importância.

REFERÊNCIAS

AITKEN, I. D.; CLARCKSON, M. J.; LINKLATER, K. Enzootic abortion of ewes. **Veterinary Record**, v.10, p.136-138, 1990.

AL-QUDAH, K. M.; SHARIF, L. A.; RAOUF, R. Y.; HAILAT, N. Q.; AI-DOMY, F. M. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila abortus* show in awassi sheep and local goats in Jordan. **Veterinary Medicine**, v.49, n.12, p.460-466, 2004.

APEL, J.; HUBSCHLE, O. J.; KRAUSS, H. Seroprevalence of *Chlamydia psittaci*-specific antibodies in small stock in Namibia: epidemiological study with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v.36, n.6, p.447-458, 1989.

APPLEYARD, W. T.; AITKEN, I. D.; ANDERSON, I. E. Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep. **Veterinary Record**, v.166, p.535-538, 1985. BALL, L.; GRINER, L. A.; CARROL, E. J. The bovine seminal vesiculitis syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p.291-302, 1964.

BORDE, G.; LOWHAR, G.; ADESIYUN, A. A. *Toxoplasma Gondii* and *Chlamydophila abortus* in caprine abortion in Tobago: a sero-epidemiological estudy. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v.53, p.188-193, 2006.

BOREL, N.; DOHERR, M. G.; VRETOU, E.; PSARROU, E.; THOMA, R.; POSPISCHIL, Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.65, p.205-216, 2004.

BROWN, P. A., NEWMAN, J. A. Methods of chlamydial antigen detection. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.195, n.11, p.1567-1570, 1989.

BUENDÍA, A. J.; CUELLO, F.; DEL RIO, L.; GALLEGU, M. C.; CARO, M. R.; SALINAS, J. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydiapsittaci* serotype 1) infection. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.229-239, 2001.

BUXTON, D.; BARLOW, R. M.; FINLAYSON, J.; ANDERSON, I. E.; MACKCLLAR, A. Observation on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.102, p.221-237, 1990.

BUXTON, D.; HENDERSON, D. D. Infectious abortion in sheep. **In Practice**, v.21, p.360-368, 1999.

BUXTON, D.; ANDERSON, I.; LONGBOTTON, D. LIVINGSTONE, M.; WATTEGEDERA, S.; ENTRICAN, G. Ovine Chlamydial abortion; histopathological identification and analysis of immune cells in placental tissues. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, p.133-141, 2002.

CANFIELD, P. J.; LOVE, D. N.; MEARN, G.; FARRAM, E. Evaluation of an immunofluorescence test on direct smears of conjunctival and urogenital swabs taken from koalas for the detection of *Chlamydia psittaci*. **Australian Veterinary Journal**, v.68, p.165-169, 1991.

CORSARO, D.; VALASSINA, M.; VENDITTI, D. Increasing diversity within Chlamydial. **Critical Review in Microbiology**, v.29, n.1, p.37-78, 2003.

DeGRAVES, F. J.; KIM, T.; JEE, J.; SCHALAPP, T.; HEHNEN, H. R.; KALTENBOECK, B. Reinfection with *Chlamydophila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydophila*. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2538-2545, 2004.

DONN, A.; CARNIELETTO, P.; CHIARACANE, G. LADU, M.; MACHELE, J.; MANDOLA, M. I.; RUIU, A.; STANCANELLI, A.; TURILLI, C. Standardizzazione della tecnica di fissazione del complemento per la dimostrazione di anti-chlamydia nel siero de sangue. **II Progresso Veterinário**, v.4, p.125-128, 1997.

ENTRICAN, G.; BROWN, J.; GRAHAM, S. Cytokinas and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.21, p.15-26, 1998.

ENTRICAN, G., BUXTON, D., LONGBOTTON, D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.94, p.273-277, 2001.

EVERETT, K.D.E. Chlamydial and Chlamydiales: more than meet the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

FREITAS, J. A.; MACHADO, R. D. Isolamento de *Chlamydia psittaci* em búfalos abatidos para consumo em Belém, Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.8, p.43-50, 1988.

GRIFFITHS, P. C.; PHILIPIS, H. L.; DAWSON, M.; CLARKSON, M. J. Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.165-177, 1992.

GRIMES, J. E.; DALF, B. E.; GRUMBLES, L. C.; PEARSON, J. E.; VICE, T. E. A manual of methods for laboratory diagnosis of avian chlamydiosis. **American Association Avian Pathology**, Kennet Square, PA, 1987.

GOMES, M. J. P.; WALD, V. B.; MACHADO, R. D.; SILVEIRA, M. C. Isolamento de *Chlamydia psittaci* em touros com vesiculite seminal, no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.119, p.43-46, 2001.

JONES, G. E.; ANDERSON, I. E. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? **Research in Veterinary Science**, v.44, p.260-261, 1988. JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole. 2000. p.1415.

KAUFFOLD, J.; MELZER, F.; HENNING, K.; SCHULZE, K.; LEIDING, C.; SACHSE, K. Prevalence of chlamydiae in boars and sêmem used for artificial insemination. **Theriogenology** (2005), doi 10.1016/j.theriogenology.2005.10.010.

KEER, K.; ENTRICAN, G.; McKEEVER, D.; LONGBOTTOM, D. Immunopathology of *Chlamydophila abortus* infection in sheep and mice. **Research in Veterinary Science**, v.78, n.1, p.1-7, 2005.

LAROUCAU, K.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using pmp genes. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.155-164, 2001.

LONGBOTTOM, D.; PSARROU, E.; LIVINSTONE, M.; VRETOU, E. Diagnosis of ovine abortion using an indirect ELISA (PomP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein PomP91B of *Chlamydophila abortus*. **Fems Microbiology**, v.195, p.157-161, 2001.

LONGBOTTON, D.; COULTER, L. J. Animal chlamydiosis and zoonotic implication. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.217-244, 2003.

MAFNAR-JAFME, R. C.; de la CRUZ, C.; VÁSQUEZ-BOLAND, J. A. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. **Small Ruminant Research**, v.28, p.131-138, 1998.

MASALA, G.; PORCU, R.; SANNA, G.; TANDA, A.; TOLA, S. Role of *Chlamydophila abortus* in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italia. **Veterinary Research Communication**, v.29, n.1, p.117-123, 2005.

MEIJER, A.; BRANDENBURG, A.; de VRIES, J.; BEENTJES, J.; ROHOLL, P and DERCKSEN, D. *Chlamydophila abortus* infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats. **European journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.23, n.6, p.487-90, 2004.

NANDA, N. K.; RAO, A. T.; NAYAK, B. C.; RAO, A. G.; MISHRA, P. R. Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle. **Indian Veterinary Journal**, v.69, p.483-486, 1992.

NAVARRO, J. A.; GARCIA DE LA FUENTE, J. N.; SANCHES, J.; MATRINEZ, C. M.; BUENDIA, A. J.; GUTIERREZ-MARTIN, C. B.; RODRIGUES-FERRI, E. F.; ORTEGA, N.; SALINAS, J. Kinetics if infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Pathology**, v.41, n.5, p.498-505, 2004.

O.I.E (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). Ovine chlamydiosis. In: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th edition**. Paris: OIE, 2004. Acessado em 02.10.2006. Online. Disponivel em <http://www.oie.int/>.

ORR, M. B. Sheep abortions-Invermay [New Zcaland]. **Surveillance**, v.16, p.24-25, 1989.

PAPP, J. R.; SHEWEN, P. E. Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. **Journal of Infectious Diseases**, v.174, p.1296-1302, 1996a.

PAPP, J. R.; SHEWEN, P. E. Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. **Infection and Immunity**, v.62, p. 1116-1125, 1996b.

PUGLIESE, A.; NUTTA, P. P.; PANTANO, V.; CALFMERL S.; ANZALONE, C.; SQUERI, R.; LA FAUCI, U. Epidemiological studies on the prevalence of bovine chlamydiosis in Calabria. **Atti dela Societa Italiana di Buiatria**, v.23, p.183-188, 1991.

RODOLAKIS, A.; BERNARD, K. Isolament de chlamydia des organes genitaux de beliers atteints depididymite. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v.50, p.65-70, 1977.

ROMJIN, P. C.; LIBERAL, M. H. T. Cultivo de *Chlamydia* em diferentes sistemas celulares: um estudo comparativo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.25, n.1, p. 15-18, 1990.

SALTI-MONTESANTO, V.; TSOLI, E.; PAPAVALASSILOU, P.; PSARROU, E.; MARKEY, B. K.; JONES, G. E.; VRETOU, E. Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibody against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.228-235, 1997.

SEAMAN, J. T. Chlamydia isolates from abortion in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.62, p.436, 1985.

SOUZA, C. A. I.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; PAULIN, L. M.; SCARELLI, E.; CARDOSO, M. V.; TURILLI, C. Ocorrência de anticorpos anti-chlamydofila em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.1, p.28-33, 2004.

STAMP, J. T.; McEWEN, A. D.; WATT, J. A. A.; NISBET, D. I. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. **Veterinary Record**, v.62, p.251-254, 1950.

STORZ, J.; MCKERCHER, D. G.; HOWARTH, J. A.; STRAUB, O. C. The isolation of a viral agent from enzootic bovine abortion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.137, p.509-514, 1960.

STORZ, J.; CARROL, E. J.; BALL, L.; FAULKNER, L. C. Isolation of a psittacosis agent (*Chlamydia*) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, p.549-555, 1968.

SZEREDI, L.; BACSADI, A. Detection of *Chlamydofila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma Gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by streptavidin-biotin method. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, p.257-263, 2002.

TEANKUM, K.; POSPISCHIL, A.; JANETT, F.; BURGI, E.; BRUGNERA, E.; HOELZLE, K.; POLKINGHORNE, A.; WEILENMANN, R.; ZIMMERMANN, D. R.; BOREL, N. Detection of *chlamydiae* in boar semen and genital tracts. **Veterinary Microbiology** (2006), doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.021.

THIELE, D.; KARO, M.; KRAUSS, H. Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Chlamydia psittaci* in veterinary clinical specimens. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.277, p.39-48, 1992.

VANROMPAY, D.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**, v.29, p. 1188-1193, 1995.

VEZNIK, Z.; SVECOVA, D.; POSPISIL, L.; DIBLIKOVA, I. Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence. **Veterinary Medicine**, v.41, p.201-206, 1996.

WANG, F. I.; SHIEH, H.; LIAO, Y. K. Prevalence of *Chlamydia abortus* infection in domesticated ruminants in Taiwan. **Journal of Veterinary Science**, v.63, p.1215-1220, 2001.

WILSMORE, A. J.; PARSONS, V.; DAWSON, M. Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. **British Veterinary Journal**, v.140, p.380-391, 1984.

WITTENBRINK, M. M.; SCHOON, H. A.; BISPING, W.; BINDER, A. Infection of the bovine female genital tract with *Chlamydia psittaci* as a possible cause of infertility. **Reproduction of Domestic Animals**, v.28, p.129-136, 1993.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em ovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar anticorpos contra *Chlamydophila*, pela prova de fixação de complemento, em ovinos de propriedades localizadas na região de Londrina, Paraná.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Chlamydophila* spp EM OVINOS DE PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ.

RESUMO

A *Chlamydophila abortus* é uma bactéria causadora de doença da esfera reprodutiva em algumas espécies de animais de interesse econômico, sendo responsável pelo aborto enzoótico ovino. Em muitos países ela é responsável pela maioria dos abortamentos nos ovinos, causando grandes perdas econômicas, além de implicações na saúde pública. O objetivo deste trabalho foi estimar a soroprevalência de anticorpos *anti-Chlamydophila* em ovinos de propriedades localizadas em municípios da região de Londrina, Estado do Paraná. A prova de fixação de complemento foi realizada em 267 amostras de soro sanguíneo de ovinos, provenientes de oito propriedades, sendo considerados positivos os animais que apresentaram títulos > 32. Foram detectados 19 (7,11%) animais positivos, e sete (87,50%) propriedades tiveram pelo menos um animal positivo. Nestas propriedades, os sinais clínicos descritos foram abortamento, natimortalidade, nascimento de crias fracas e repetição de cio. Do total de soros positivos, apenas um apresentou título de 64 e outro de 128, enquanto os demais 17 apresentaram títulos de 32.

Palavras-chave: *Chlamydophila abortus*. Prova de fixação de complemento. Diagnóstico. Prevalência. Aborto enzoótico ovino. Problema reprodutivo.

PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST *Chlamydophila* spp IN EWES FROM PROPERTIES IN CITIES IN THE REGION OF LONDRINA, PARANA.

ABSTRACT

Chlamydophila abortus is a bacterium known for causing reproductive diseases in some species of animals which have economic interest, being known as the responsible for ovine enzootic abortion. In several countries, this bacterium is responsible for the majority of ovine abortions, causing great economic losses as well as implications on public health. The aim of this study is to estimate the seroprevalence of anti-*Chlamydophila* antibodies in ewes from properties in the region of Londrina, in northern Parana. Complement fixation tests were performed in 267 samples of ovine blood sera, collected in eight different properties. Animals presenting titers > 32 were considered positive. From the samples analyzed, 19 (7.11%) animals were considered positive, and seven (87.50%) of properties had at least one positive animal. In those properties, the clinical symptoms described were abortion, natimortality, weak offsprings and repetition of estrus. From the total positive sera, only one presented titer of 64 and another of 128, whereas the remaining 17 presented titers of 32.

Keywords: *Chlamydophila abortus*. Complement fixation test. Diagnosis. Prevalence. Ovine enzootic abortion. Reproductive problems.

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Chlamydophila* causam ampla variedade de doenças em ruminantes incluindo poliartrite, pneumonia, conjuntivite e aborto (EVERETT, 2000).

O aborto enzoótico ovino (AEO), causado pela *Chlamydophila abortus* (*C. abortus*) é reconhecido como a maior causa de abortamento em ovinos e caprinos em muitos países levando a grandes perdas econômicas (WANG et al, 2001; SZEREDI; BACSADI, 2002; SHARMA et al., 2003; MASALA et al., 2005). No Reino Unido a doença é responsável por 50,00% dos abortos diagnosticados (WOOD, 1992). Além do fator econômico, esta bactéria possui conhecido potencial zoonótico, sendo um grande risco para mulheres grávidas (MEIJER et al., 2004).

Em ovelhas o AEO resulta em placentite necrótica, e dependendo da extensão dos danos causados leva ao aborto no período final de gestação, nascimento de animais prematuros ou de cordeiros fracos, enquanto nos machos causa vesiculite, epididimite e orquite (RODOLAKIS et al., 1998; GOMES et al., 2001).

A doença se dissemina facilmente no rebanho, principalmente nos períodos de parto, onde grande número de bactérias é eliminado juntamente com a placenta e descarga uterina no meio ambiente servindo como via de transmissão para outros animais (AITKEN et al, 1990). Quando o AEO entra em um rebanho pela primeira vez, a taxa de aborto pode ser superior a 30,00%, depois a doença tende a tornar-se endêmica e as perdas anuais giram em torno de 5,00% a 10,00% (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). Ovelhas infectadas pela primeira vez só irão demonstrar sinais clínicos da doença nas últimas semanas da próxima prenhez (AITKEN, 2000).

Entre os métodos diagnósticos utilizados e recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) está a prova de fixação de complemento, que pode ser aplicada em rebanhos para detectar evidências de infecção por clamidófilas (TRÁVNICEK et al., 2001).

No Brasil, a ausência de pesquisas sobre a ocorrência da *C. abortus* em ovinos, não permite conhecer a verdadeira situação da doença. O objetivo deste trabalho foi verificar a soroprevalência de anticorpo contra *Chlamydophila* em ovinos de propriedades da região de Londrina, Estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Do total de 2630 animais, foram coletadas 267 amostras de sangue de ovelhas, em idade reprodutiva, no período de dezembro a novembro de 2005, provenientes de oito propriedades, identificadas de A a H, localizadas em municípios da região de Londrina. O critério de inclusão destas propriedades era a presença de cadastrado na Secretaria da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SEAB). O tamanho da amostra foi calculado utilizando o programa EPI-INFO-6,4 (DEAN et al., 1994) com prevalência estimada em 50%, erro de 6% e nível de confiança de 95%. A amostragem dos animais foi proporcional ao tamanho do rebanho em cada propriedade e a escolha dos animais realizadas de forma aleatória.

A colheita do sangue foi realizada pela venopunção jugular, utilizando-se sistema a vácuo estéril sem anticoagulante (Vacuttainer), após assepsia local, com álcool iodado, retirando-se, aproximadamente, 10 mL de sangue por animal. Esse material foi mantido em temperatura ambiente até a formação e retração do coágulo, para obtenção do soro. As

amostras foram identificadas, divididas em duas alíquotas em tubos plásticos e conservadas em freezer (-20°C), até o momento de sua utilização.

Prova de fixação de complemento

A detecção de anticorpos contra *Chlamydophila* spp foi realizada pela prova de fixação de complemento, utilizando microplacas de titulação de 96 poços, segundo DONN et al. (1997).

A produção de antígeno para a realização da prova de fixação de complemento, foi realizada através da inoculação da estirpe de referência *C. abortus* S26/3 (fornecida pelo Dr Carlo Turilli-Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova-Itália) no saco vitelino de ovos embrionados de galinha. O antígeno foi titulado utilizando soro controle positivo, com título de 512, (fornecida pelo Dr Carlo Turilli-Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova-Itália). Após alíquotado o antígeno foi conservado a 4°C até o momento de sua utilização (DONN et al., 1997). Como soro controle negativo foi utilizado soro fetal bovino (Gibco -USA).

Para a realização do teste foi utilizado sangue de ovinos, sorologicamente negativos para *C. abortus*, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, coletado em solução de Alsever, em igual volume e mantidos em alíquotas de 10 mL a + 4°C por até 30 dias. As hemácias foram diluídas a 2,00% em tampão veronal (CAMBREX[®]) e usadas por no máximo 5 dias.

A hemolisina (Laborclin[®]) foi mantida a - 20°C até o uso, onde eram diluídas ao correspondente a duas unidades hemolíticas.

O sistema hemolítico, usado como sistema revelador do teste, foi preparado adicionando igual volume de hemolisina à solução de hemácias a 2,00%. E incubado em banho-maria a 37°C, por 15 minutos para a sensibilização das hemácias.

Complemento de cobaios (Laborclin) foi diluído, em banho de gelo, aliqotado e armazenado a -20°C até o momento do uso e então foram utilizados na diluição correspondente a duas unidades.

Após triagem com os soros a uma diluição de 1:32, os considerados positivos foram diluídos até 1:1024, na base dois em tampão veronal e inativados a 58°C por 30 minutos.

Ao soro, foram adicionados 25uL do antígeno e 25uL do complemento. A placa foi agitada por dois minutos e incubada a 37°C por 30 minutos, e após a adição de 25uL do sistema hemolítico, a placa foi novamente incubada nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Cada placa foi feita em duplicata, sendo que na segunda placa não foi adicionado o antígeno, para se avaliar a anticomplementaridade dos soros testados. Em todas as placas foram feitos controle do sistema hemolítico e antígeno na presença ou ausência do complemento e controle de hemácias.

A leitura foi realizada visualmente, sendo a formação de um botão considerada uma reação positiva, e a presença de 100% de hemólise considerada como negativa.

Foram consideradas positivas as amostras com título igual ou superior a 32 de acordo com a OIE (2004).

RESULTADOS

Dos 267 soros de ovinos testados, 19 (7,11%) provenientes de sete propriedades foram positivos na prova de fixação de complemento. Na propriedade A foram detectados seis (19,35%) soros positivos, na B um (6,25%), na C três (20,00%), na D dois (18,18%), na E um (10,00%), na F quatro (5,88%) e na G dois (1,98%). Do total de soros positivos apenas na propriedade G um soro apresentou título de 64 e outro soro título de 128, os demais 17 soros apresentaram títulos de 32 (tabela 1).

DISCUSSÃO

O AEO é uma doença complexa e importante em rebanhos ovinos de muitos países com repercussão na economia e também na saúde pública (RODOLAKIS et al., 1998; POSPISCHIL et al., 2002). Para a confirmação do diagnóstico do AEO é necessária a utilização de provas laboratoriais, pois os sinais clínicos são inespecíficos e comuns à maioria das doenças da esfera reprodutiva. A OIE (2004) preconiza a prova de fixação de complemento para realizar o diagnóstico da doença, pela detecção de anticorpo contra *Chlamydophila*. Esta prova tem sido utilizada no Reino Unido e Escócia, países onde existe programa de controle do AEO (SOUZA et al., 2004).

A prova de fixação de complemento possui uma sensibilidade de aproximadamente 71% e especificidade de 83%, com bons resultados na detecção de anticorpos contra *Chlamydophila* em rebanhos com AEO clínico, e aceitável especificidade em rebanhos negativos para *C. abortus*. Entretanto esta prova mostra sérias limitações na detecção de animais positivos sem problemas de aborto, mas com clamidofilose crônica (BUENDIA et al., 2001). A especificidade baixa ocorre devido a presença de antígenos comuns da *C. abortus*

com algumas bactérias Gram negativas e a todos os membros da família *Chlamydiaceae*, principalmente a *C. pecorum* (EVERETT, 2000; RODOLAKIS et al., 2001; TRÁVNICEK et al., 2003).

No presente trabalho, utilizando a prova de fixação de complemento, foram detectados 19 (7,11%) animais positivos, distribuídos em sete propriedades (87,50%). Das propriedades que apresentaram animais com títulos positivos, somente na G foi detectado um animal com título 64 e outro com 128, enquanto nas outras propriedades todos os animais positivos apresentaram títulos de 32. Segundo WILSMORE et al. (1984) a soroconversão nas ovelhas ocorre nas semanas seguintes à infecção primária com *C. psittaci*, mas os títulos de anticorpos tendem a ser baixos e transitórios, enquanto após o aborto os títulos são maiores e persistem por vários meses. RODOLAKIS et al. (2001) afirmaram que títulos menores que 40 não são específicos para *C. abortus* e devem ser considerados como infecção por *C. pecorum*. Neste trabalho foi utilizado como ponto de corte o critério adotado pela OIE (2004) que considera positivo os títulos > 32 e títulos menores que 32 interpretados como não específico para *C. abortus*, podendo ser reação cruzada especialmente com *C. pecorum*. AL-QUDAH et al. (2004) afirmaram que esta bactéria está presente no trato intestinal de alguns ovinos sem causar nenhuma alteração patológica significativa e induz a produção mínima de anticorpo quando comparada com a *C. abortus*. Resultados falsos positivos devido a vacinação não foram considerados neste trabalho, pois a vacina contra *C. abortus* não está disponível comercialmente no Brasil.

Estudos realizados na Espanha e Jordânia demonstraram prevalências de respectivamente 50,50% e 21,80% de animais sororeagentes para AEO (MAFNAR-JAFME et al., 1998; AL-QUDAH et al., 2004), enquanto na Alemanha 70,00% dos rebanhos pesquisados foram considerados infectados (BOSTEDT; DEDIÈ 1996). No Brasil, o único estudo para detectar anticorpos contra *Chlamydia* em bovinos foi realizado no Estado de

São Paulo, pela prova de fixação de complemento e foi detectado uma ocorrência de anticorpos em 22 (5,30%) animais pertencentes a 14 (51,90%) dos 27 rebanhos estudados (SOUZA et al., 2004). A confirmação da presença do agente do AEO no país foi obtida no Rio Grande do Sul por GOMES et al (2001) que isolaram *C. psittaci* (provavelmente *C. abortus*) em touros com vesiculite seminal.

Nas sete propriedades positivas do presente trabalho foram descritos aborto e natimortalidade em seis delas, repetição de cio em quatro e nascimento de crias debilitadas em três. Estes problemas reprodutivos são considerados por SHEWEN (1980) os principais sinais do AEO. Na propriedade H, onde todos os animais foram negativos na prova de fixação de complemento, os problemas reprodutivos relatados foram natimortalidade e ausência de cio.

Apesar dos problemas reprodutivos encontrados nos animais das sete propriedades positivas serem comuns a outros microrganismos, os títulos sorológicos encontrados nesses animais sugerem a presença de *C. abortus* nos rebanhos estudados.

Este estudo, realizado com animais do Estado do Paraná, representa o primeiro trabalho de soroepidemiologia da clamidofilose visando a *C. abortus* em ovinos do Brasil, entretanto novos estudos devem ser realizados para se obter a prevalência do AEO no país.

CONCLUSÕES

A elevada frequência (87,50%) de propriedades com pelo menos um animal positivo e a presença de 19 (7,11%) animais positivos na prova de fixação de complemento, indicam a presença de anticorpos contra *Chlamydophila* nos animais das propriedades estudadas.

Novos estudos sobre epidemiologia do AEO devem ser realizados para se obter dados mais abrangentes da doença no país, para se necessário adotar medidas de profilaxia e controle da doença.

Tabela 1 – Resultado da prova de fixação de complemento, para detecção de anticorpos contra *Chlamydophila*, realizada em ovinos de oito propriedades da região de Londrina, Paraná, 2006.

Propriedades	Total de ovinos	Ovelhas amostradas			Títulos encontrados
		total	positivos	%	
A	350	31	6	19,35	32
B	130	16	1	6,25	32
C	150	15	3	20,00	32
D	100	11	2	18,18	32
E	130	10	1	10,00	32
F	670	68	4	5,88	32
G	950	101	2	1,98	64
H	150	15	0	0	128
Total	2630	267	19	7,11	0

REFERÊNCIAS

AITKEN, I. D. Chlamydial abortion. In: W. B. Martin and I. D. Aitken. **Disease of sheep**. 3^a ed. Blackwell Science, Oxford, p.81-86, 2000a.

AITKEN, I. D.; CLARCKSON, M. J.; LINKLATER, K. Enzootic abortion of ewes. **Veterinary Record**, v.10, p.136-138, 1990.

AL-QUDAH, K. M. et al. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydomydia abortus* show in awassi sheep and local goats in Jordan. **Veterinary medicine**, v.49, n.12, p.460-466, 2004.

BOSTEDT, H.; DEDIÈ, K. Chlamydien abort. **Schafkrankheiten**. Hrsg. H. Bosted, Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart, 1996.

BUENDIA, A. J. et al. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydomydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.229-239, 2001.

DEAN A.G. et al. Epi Info, version 6: a word processing, data base and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, [computer program]: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

DONN, A. et al. Standardizzazione della tecnica di fissazione del complemento per la dimostrazione di anti-chlamydia nel siero de sangue. **II Progresso Veterinário**, v.4, p.125-128, 1997.

EVERETT, K.D.E. Chlamydial and Chlamydiales: more than meet the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

GOMES, M. J. P. et al. Isolamento de *Chlamydomydia psittaci* em touros com vesiculite seminal, no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.119, p.43-46, 2001.

LONGBOTTON, D.; COULTER, L. J. Animal chlamidiosis and zoonotic implication. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.217-244, 2003.

MAINAR-JAIME, R. C.; de la CRUZ, C.; VÁSQUEZ-BOLAND, J. A. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. **Small Ruminant Research**, v.28, p.131-138, 1998.

MASALA, G. et al. Role of *Chlamydomphila abortus* in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italia. **Veterinary research Communication**, v.29, n.1, p.117-123, 2005.

MEIJER, A. et al. *Chlamydomphila abortus* infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.23, n.6, p.487-90, 2004.

O.I.E (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). Ovine chlamydiosis. In: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th edition**. Paris: OIE, 2004. Acessado em 07.03.2007. Online. Disponivel em <http://www.oie.int/>.

POSPISCHIL, A. et al. O. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). **Swiss Medical Weekly**, v.132, p.64-66, 2002.

RODOLAKIS, A. Caprine chlamydiosis. In: **Tempesta M.** ed: Recent Advances in goat Diseases, 2001.

RODOLAKIS, A.; SALINAS, J.; PAPP, J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. **Veterinary Research**, v.29, p.275-288, 1998.

SHARMA, S. P. et al. Isolation of *Toxoplasma Gondii* from goats with history of reproductive disorders and the prevalence of *Toxoplasma* and *Chlamydial* antibodies. **Onderstepoort Journal of Veterinary research**, v.70, p.65-68, 2003.

SHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, p.2-11, 1980.

SOUZA, C. A. I. et al. Ocorrência de anticorpos anti-chlamydomphila em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.1, p.28-33, 2004.

SZEREDI, L.; BACSADI, A. Detection of *Chlamydomphila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma Gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by streptavidin-biotin method. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, p.257-263, 2002.

TRÁVNICEK, M. et al. Serosurvey of sheep and goats to *Chlamydia psittaci* in Slovakia during the year 1996-2000. **Vet Med**, Czech, v.46, p.281-285, 2001.

TRÁVNICEK, M. et al. Detection of IgG antibodies against *Chlamydophila abortus* in sheep with reproductive disorders. **Acta Veterinaria Brno**, v.72, p.95-99, 2003.

WANG, F. I.; SHIEH, H.; LIAO, Y. K. Prevalence of *Chlamydophila abortus* infection in domesticated ruminants in Taiwan. **Journal of Veterinary Science**, v.63, p.1215-1220, 2001.

WILSMORE, A. J., PARSONS, V., DAWSON, M. Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. **The British Veterinary Journal**, v.140(4), p.380-391, 1984.

WOOD, R. Enzootic abortion costs home industry £m pa. **Farmer Weekly**, v.117, p.60, 1992.

ANEXOS

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL, SANTA MARIA.

Ciência Rural, Santa Maria, RS.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões bibliográficas e notas devem ser encaminhados em três vias, datilografados e/ou editados em idioma Português ou Inglês e paginados. O trabalho deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297mm, com no **máximo, 28 linhas em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota**, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações. Cada gráfico, figura, ilustração ou tabela equivale a uma página. **Enviar a forma digitalizada somente quando solicitada.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Agradecimento(s); Fontes de Aquisição, quando houver, e Referências Bibliográficas. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências Bibliográficas. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave;

Abstract; Key words; Texto [sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão (podendo conter tabelas ou figuras)]; Fontes de aquisição se houver; Referências Bibliográficas. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista.

7. Os nomes dos autores deverão ser colocados por extenso abaixo do título, um ao lado do outro, seguidos de números que serão repetidos no rodapé, para a especificação (formação, titulação e instituição) e indicação de autor para correspondência (com endereço completo, CEP e obrigatoriamente **E-mail**). Faculta-se a não identificação da autoria em duas cópias dos artigos enviados.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos. Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências Bibliográficas deverão ser efetuadas conforme ABNT (NBR 6023/2000):

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Três autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

AUDE, M.I.S. et al. (Mais de 2 autores) Época de plantio e seus efeitos na produtividade e teor de sólidos solúveis no caldo de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.131-137, 1992.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal: identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o **endereço completo do autor** (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral:** análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

LeBLANC, K.A. **New development in hernia surgery**. Capturado em 22 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.medscape.com/Medscape/surgery/TreatmentUpdate/1999/tu01/public/toc-tu01.html>.

UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital**, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. Tabelas e figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. Os desenhos e gráficos (em largura de 7,5 ou 16cm) devem ser feitos em editor gráfico impresso a laser, em papel fotográfico glossy sempre em qualidade máxima, e devem conter no verso o nome do autor, orientação da borda superior e o número das legendas correspondentes, as quais devem estar em folhas à parte. Alternativamente, após aprovação as figuras poderão ser enviadas digitalizadas com ao menos 800dpi, em extensão .tiff. **Fotografias, desenhos e gráficos** devem ser enviados, **obrigatoriamente, em três vias**. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. O ofício de encaminhamento dos artigos deve conter, **obrigatoriamente, a assinatura de todos os autores** ou termo de compromisso do autor principal, responsabilizando-se pela inclusão dos co-autores.

página impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página. Este pagamento também deverá ser anexado no momento da devolução do artigo rubricado obedecendo uma das duas formas previamente mencionadas. O remetente do numerário deverá deixar claro em nome de quem o recibo deverá ser emitido, pessoa física enviar o número do CIC e no caso de pessoa jurídica CNPJ e

13. Taxas de publicação e tramitação

Ciência Rural cobra taxas de tramitação e publicação de artigos. A taxa para tramitação será o equivalente a US\$ 7,00 por trabalho submetido; e a taxa para publicação será de US\$ 10,00 por página impressa. Os pagamentos deverão ser feitos em reais (R\$), de acordo com a taxa de câmbio comercial do dia. Essas taxas deverão ser pagas no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 2503042 em nome da FATEC - Projeto 95304. Alternativamente poderá ser enviado um cheque no valor correspondente em nome da FATEC. Pagamentos por cartão de crédito VISA são também aceitos. A submissão do artigo deverá ser obrigatoriamente acompanhada do recibo da taxa de tramitação (cheque correspondente ou cartão de crédito). **A taxa de submissão é obrigatória para todos os trabalhos independentemente de ser assinante.** A taxa de publicação somente deverá ser paga (e o comprovante anexado) após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores. **Os pesquisadores assinantes da Ciência Rural não pagarão a taxa de publicação, se pelo menos um dos autores for assinante.** Professores do Centro de Ciências Rurais e dos Programas de Pós-graduação do Centro têm seus artigos previamente pagos por esse Centro, estando isentos da taxa de publicação, devendo, no entanto, pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de US\$ 120,00 equivalente por

inscrição estadual caso não seja isento (ex.: instituições privadas).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.