

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E DETECÇÃO DA *Brucella*
***ovis* CEPA REO 198 EM OVINOS INOCULADOS**
EXPERIMENTALMENTE PELAS VIAS INTRAPREPUCIAL E
CONJUNTIVAL SIMULTANEAMENTE

NAIR SILVA CAVALCANTI DE LIRA

BOTUCATU – SP

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E DETECÇÃO DA *Brucella*
***ovis* CEPA REO 198 EM OVINOS INOCULADOS**
EXPERIMENTALMENTE PELAS VIAS INTRAPREPUCIAL E
CONJUNTIVAL SIMULTANEAMENTE

NAIR SILVA CAVALCANTI DE LIRA

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

Orientadora: Profa. Dra. Jane Megid

Co-orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer
Amorim

Nair Silva Cavalcanti de Lira. Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intrapreputal e conjuntival simultaneamente. Defesa: 30/06/2008 Local: FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Jane Megid

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal Rural de Pernambuco - PE

Prof. Dr. Leucio Camara Alves

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal Rural de Pernambuco - PE

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Dedico esta tese a
Nair da Cunha Cavalcanti

Minha querida Avó és pra mim o que posso chamar de amor mais puro e sincero, a força para os dias onde não havia mais coragem, o colo na hora do choro, o consolo nas horas de tristeza, a alegria no mais simples sorriso. Nas lembranças que tenho desde criança, foste o meu sol e o meu luar e agüentei e segui caminho porque sabia que no fundo me dizias pra que eu nunca desistisse e sempre seguisse em frente. Nunca imaginei que fosse experimentar um amor tão intenso, sem restrições, um amor sem nenhuma limitação... Minha Vozinha, és a pessoa que mais amo neste mundo e sempre amarei em todos os momentos da minha vida, és uma parte de mim e sem ti, todas as vezes que estive longe, me senti vazia. Mas, Deus me deu o maior presente do mundo que foi tê-la como avó. E por ter experimentado a convivência desta vida ao seu lado eu serei grata sempre, sempre, sempre! Te amo!

Maria Edneide Cavalcanti de Lira

Tia, você guiou meus passos desde o começo, muito obrigada por ser tão dedicada e por acreditar em mim. Sem você, nada disso teria sido possível, esta conquista é "nossa". Te amo!

AGRADECIMENTOS

Não é fácil encontrar palavras para agradecer àqueles que estiveram ao meu lado durante mais esta etapa de minha vida, assim como também não é fácil dizer a cada um deles o quanto foram importantes para mim. Difícil ainda é conseguir demonstrar através de um simples agradecimento o quanto foram únicos. Agradeço a todos, antecipadamente, que estiveram envolvidos em mais este projeto da minha vida.

À **Deus**, por estar ao meu lado abrindo sempre os meus caminhos. A fé, o amor e a confiança Nele, fortaleceram cada passo de minha vida. Agradeço Senhor, por ter me dado o dom de amar os animais e de me permitir estudar para estar sempre mais próximo deles.

À minha **Avó Nair da Cunha Cavalcanti**, que me permitiu estar ao seu lado, em seu convívio, com seu amor, com seu carinho, com sua dedicação, com sua bondade, com sua delicadeza e sutileza com quem trata a todos, com sua humildade e sua beleza, não existe Avó no mundo melhor que você, pode até existir igual, mas melhor nunca! Voinha, muito obrigada por tantas vezes abdicar da sua felicidade, para contemplar a minha. Se pudesse, daria 30 anos da minha vida para cada ano de convívio ao seu lado, minha vó-mãe. Sei que hoje, infelizmente por motivo de saúde a senhora não está aqui comigo fisicamente, mas todo o amor que me foi dispensado é o combustível para que eu esteja aqui.

À minha Tia **Maria Edneide Cavalcanti**, agradeço muito. É muito fácil ser “mãe” quando se tem um filho do próprio ventre, porém ser mãe por opção é uma das tarefas mais difíceis que existe. A minha Tia, Madrinha e Mãe, agradeço por tudo, pela força, pela coragem que sempre me deu, pela amizade, pelo companheirismo, por ter acreditado em mim em todos os momentos e por em nenhum minuto ter deixado de me acompanhar nessa longa estrada.

Aos meus pais **Antonio Cavalcanti** e **Suely Silva**, agradeço por poder estar aqui neste momento, pelo apoio, pelo carinho, pelo amor. Apesar de todas as dificuldades, sempre estiveram ao meu lado.

A minha irmã **Ana Karolina Cavalcanti**, apesar das nossas diferenças, normais entre irmãs, no momento em que mais precisei, com relação a nossa “Mabelle”, foi você quem esteve lá, você foi única, muito obrigada! Mesmo criadas separadas, somos iguais em muitas coisas.

Ao meu avô centenário **João Lira** (101 anos), que o senhor ainda viva muito mais tempo ao nosso lado. Obrigada pela convivência, pelo amor e pela torcida.

À minha tia **Maria Edleuza Cavalcanti**, que mesmo com algumas diferenças, sempre esteve presente me apoiando.

A minha tia **Marinalva Silva** e **Mário**, pelas vezes que me receberam em sua casa sempre com muito carinho e muita atenção. Muito obrigada!

A minha orientadora, Professora **Dra. Jane Megid**, pela oportunidade de poder fazer um doutorado em uma instituição com estrutura e recursos, pela oportunidade de aprender coisas com as quais eu nunca havia trabalhado, pela experiência adquirida. Muito obrigada!

Ao Professor **Dr. Leucio Camara Alves**, Cansei de contar às vezes que precisei de palavras amigas e de uma mão pra me guiar nos momentos de dificuldade, você sempre esteve lá. Agradeço por grande parte da formação que tive pela dedicação e atenção dispensadas a mim e pela grande amizade que com certeza não terá fim.

Ao Professor **Dr. Frederico Celso Lyra Maia**, que foi o meu primeiro orientador na graduação. Agradeço pela leitura das lâminas, por ter me passando um pouco do seu grande conhecimento com relação à patologia. Agradeço pela amizade verdadeira e pelas conversas nos intervalos das leituras. Muito do que sou hoje, também devo a você. Muito obrigada!

Ao Professor **Dr. Waldemiro Amaro da Silva Junior**, que me ajudou muito com seus conhecimentos sobre histologia.

À Professora **Dra. Renée Laufer Amorim**, minha co-orientadora. Agradeço pela atenção, pelos ensinamentos, pela disposição e pelos conhecimentos passados, agradeço por ter agüentado todo o meu “aperreio”.

Ao Professor **Dr. Sony Dimas Bicudo**, pela sua atenção, pela presteza, sempre que precisávamos tirar dúvidas com relação à parte de reprodução. Muito obrigada!

Ao Professor Titular **Dr. Hélio Langoni**, apesar de nunca termos trabalhado diretamente juntos, agradeço pelo carinho, pela atenção, pelo respeito, pelas conversas no corredor ou na sala da pós. Pelo apoio, pelo incentivo, pela confiança, pela paciência, pelos conhecimentos. Agradeço por me incentivar a sempre dar o melhor de mim. Assim como agradeço o grande carinho de Cidinha e Guilherme. Muito obrigada!

Aos Professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública **Dr. Antonio Carlos Paes**, **Dr. Germano Francisco Biondi**, **Dr. José Paes Pinto**, **Dr. Luis Carlos Souza**, **Dr. Márcio Garcia Ribeiro**, **Dr. Paulo Domingues** e **Dr. Rafael Modolo**.

Aos Professores que fizeram parte da minha formação profissional e os quais tenho muito respeito, admiração e carinho, **Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota** e **Prof. Leonildo Bento Galiza da Silva**.

À **Cristiane Nozaki** trabalhamos juntas durante muito tempo, assim acompanhei a gravidez e o nascimento da pequena Letícia, pela qual tenho muito carinho.

Ao amigo **Otávio Filho**, fizemos muitas coletas juntos. Obrigada pelo apoio e pela dedicação.

Ao **Bruno**, ao **Fernando** e ao **Paulo**, que foram contratados para nos ajudar a cuidar dos nossos carneiros do experimento e nas coletas. Agradeço a atenção dispensada a nossos animais e pela grande ajuda.

À **Vanessa Salgado**, que apesar de sermos tão diferentes pude desfrutar da sua amizade verdadeira e pude dividir um pouco do seu conhecimento e da sua técnica em laboratórios comigo. Aprendi muito com você e sou grande fã do seu profissionalismo.

A minha grande amiga **Acácia Elias**, pela dedicação, pelo apoio, por ter me adotado como parte da família nas datas mais “família” quando eu estive longe de casa.

Às amigas **Veruska Maia** e **Walkiria Prado**, pela amizade, por dividir o mesmo “teto”, por aturar alterações de humor, pelas boas conversas e risadas, por sempre estarem por perto “literalmente”. Obrigada!

Aos amigos **Ana Paula Corrêa**, **Audrey Braga**, **Cátia Voss** e **Thiago Izidoro**, não faz tanto tempo assim que entramos na vida um do outro, mas é impressionante como me sinto bem ao lado de vocês. Nunca vou esquecê-los, pois nesta vida, apenas nos reencontramos e é essa certeza que me faz ver, que nunca iremos nos separar.

À **Liliane Dantas** e **Luciano Eloy** pelas boas horas que passamos juntos, pela amizade, carinho, dedicação. Por estarem por perto nas horas de tristeza, de alegria e de saudade. Vocês são muito especiais pra mim!

Aos amigos que me receberam com tanto carinho assim que cheguei aqui **André Castro**, **Fábio Shimabukuro**, **Juliana Giatomansi**, **Rodrigo Costa**, **Simone Mangia** e **Wellington Borges** e aos que chegaram depois como Fábio André. Muito obrigada!

Aos amigos de laboratório, **João Marcelo**, **Joseane Cipriano** e **Luciana Costa**. Pelo carinho, amizade, atenção e pelas boas risadas. Sentirei muitas saudades de vocês!

Aos pós-graduandos e ex-pós-graduandos Amanda Siqueira, Ana Paula Contente, Betina Metzger, Danielle Bastos, Deolinda Carneiro, Francisco Feliciano, Gustavo Lara, Janaína Biotto, Jonas Brant, Juliano Leonidas, Haroldo Greca, Luciana Bonato, Lucilene Camossi, Karina Rasquel, Marcela Ribeiro, Marcela Trocanrelli, Priscila Barbante, Tatiana Salerno, Roberto Bolsanello.

Às residentes e amigas Leila Ulmann e Jeniffer Krauspenhar.

À pós-graduanda **Marcela Marcondes**, que com sua atenção e amizade esteve sempre disposta a tirar minhas dúvidas mesmo on line. Muito obrigada.

Aos amigos de Recife, que apesar da distância, sempre me apoiaram me dando energia pra recomeçar, cada vez que uma dificuldade aparecia: **Alessandra Ribeiro, Beatriz Vaz, Débora Rochelly, Gerlane Tavares, Fábio Brito, Fábio Hugo Correia, Goretti Varejão, Ivan (Olegário Junior), Ivana Malta, Kátia Santos, Marco Granja, Michelle Araújo, Milena Pinto, Monica Adriana e Sílvia Maria**. Muito obrigada!

Aos amigos **Julio Rodrigues, Flavia Menezes, Paola Telles e Andriago Barboza**, pela dedicação e atenção dispensadas a minha “Mabelle” durante toda nossa luta. Apesar da luta ter chegado ao fim, agradeço por mim e por ela, por terem transformado nossos dias tão difíceis, em dias mais amenos, por se dedicarem de forma tão linda e intensa e por fazerem juz à profissão “veterinário”. “Nosso” muito obrigada!

À minha amiga e cumadre **Katrianna Serpa**, por me conceder o bem de ser madrinha do já amado **Francisco**, agradeço pela sua amizade e carinho.

À **Viviane Sakzenian** e **Danilo Cereda**, “queridos vizinhos”, que conheci há tão pouco tempo, mas pelos quais já tenho um enorme carinho, agradeço pela amizade, pela atenção, pelo carinho e por me emprestarem um pouco do amor de **Cacau**. Tenho certeza que essa amizade não vai ter fim, apesar da distância.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública Adriana Pavã, Benedito Menozzi, Fernando Paganini, Jairo Zucari, Adilson Pardal, Rodrigo Carreira, Sergio Fávero, Wanderlei Forlin e Dona Rita.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação **Denise Garcia**, **Maria Manuel** e **José Roberto** pela atenção, dedicação e presteza. Muito obrigada.

Ao médico veterinário **Maurício Dasso** do Centro de Pesquisa Veterinária “DESIDÉRIO FINAMOR” FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS, por sua ajuda com o fornecimento do antígeno utilizado na prova de imunodifusão de todo o experimento.

A **Meire**, da biblioteca da UNESP-Botucatu, pela colaboração nas correções das referências e a **Selma** pela ficha catalográfica, muito obrigada.

A “**Mabelle**”, que foi “a melhor amiga” que um ser humano pode ter.

Aos carneiros, que perderam suas vidas para que pudéssemos realizar este trabalho.

Á **FAPESP** pela concessão da bolsa e auxílio pesquisa, fundamentais para o referido projeto de pesquisa, sob o número de 06/52338-1 e 04/05886-8 respectivamente.

A todos, o meu eterno agradecimento e a certeza de que sem vocês, nada disso teria sido possível.

“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático como pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem; que não conhecem a dor da derrota, mas não tem a glória de ressurgir dos escombros.

Esses pobres de espírito, ao final da jornada na Terra, não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se ante Ele por terem simplesmente passado pela vida..”

(Robert Nesta Marley)

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
Quadro 01 Presença de <i>B. ovis</i> evidenciada por PCR em órgãos de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, Botucatu, 2008.....	51

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 Testículo do carneiro aos 90 dias pós-inoculação, apresentando testículo direito maior que o esquerdo e cauda do epidídimo aumentada de tamanho.	53
Figura 2 Epidídimo do carneiro aos 90 dias pós-inoculação, apresentando cauda aumentada de tamanho e hemorragia no epidídimo direito.	53
Figura 3.a Linfonodo pré-escapular com edema na medular - 60 dias pós-inoculação - HE- 5 X.	63
Figura 3.b Pulmão, com pneumonia intersticial difusa – 30 dias pós-inoculação - HE - 10 X.	63
Figura 3.c Baço evidenciando hipoplasia de polpa branca, hiperplasia de polpa vermelha e congestão – 7 meses pós-inoculação - HE - 2.5 X.	63
Figura 3.d Fígado com infiltrado mononuclear multifocal discreto – 30 dias pós-inoculação - HE - 5 X.	63
Figura 3.e Rim, com glomerulonefrite proliferativa membranosa e presença de proteínas no espaço de Bowman e no interior dos túbulos – 30 dias pós-inoculação – HE – 20 X.	63
Figura 3.f Rim, apresentando focos calcificação na região medular – 9 meses pós-inoculação - HE - 5 X.	63
Figura 4.a Testículo, degeneração testicular e atrofia – 30 dias pós-inoculação - HE- 5 X.	70
Figura 4.b Testículo, degeneração testicular e fibrose intersticial – 12 meses pós-inoculação – HE – 10 X.	70
Figura 4.c Cabeça do epidídimo apresentando infiltrado mononuclear focal - 30 dias pós-inoculação – HE - 40 X	70
Figura 4.d Corpo do epidídimo apresentando hipoplasia dos ductos epididimários circundados com tecido fibroso denso – 45 dias pós-inoculação – HE - 10 X.	70
Figura 4.e Corpo do epidídimo apresentando espermatozóides fora do ducto epididimário – 8 meses pós-inoculação – HE -10 X.	70
Figura 4.f Cauda do epidídimo apresentando espermatozóides fora do ducto epididimário – 75 dias pós-inoculação – HE – 10 X.	70

LISTA DE TABELAS

		PÁGINA
Tabela 1	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos linfonodos de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008. (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	55
Tabela 2	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas glândulas parótidas de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	55
Tabela 3	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas glândulas mandibulares de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	56
Tabela 4	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no pulmão direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	58
Tabela 5	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no baço de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	59
Tabela 6	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no fígado de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	61

Tabela 7	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos rins direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	62
Tabela 8	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos testículos direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	65
Tabela 9	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas cabeças dos epidídimos direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	66
Tabela 10	Lesões histopatológicas observadas e porcentagem de ocorrência, nos corpos epididimários direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	68
Tabela 11	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas caudas epididimários direita e esquerda de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	69
Tabela 12	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na bexiga de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	72
Tabela 13	Lesões histopatológicas observadas e porcentagem de ocorrência, na vesícula seminal de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	72

Tabela 14	Lesões histopatológicas observadas e porcentagem de ocorrência, na vesícula seminal de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	73
Tabela 15	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na ampola do ducto seminal de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	75
Tabela 16	Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na próstata de carneiros infectados experimentalmente com <i>B. ovis</i> REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através do PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	- Microlitro
UFC	- Unidades formadoras de colônia
TBE	- Tris ácido bórico EDTA
SDS	- Sódio dodecil sulfato
REO	- Ram Epidymitis Organism
Pmol	- Picomol
pH	- potencial hidrogeniônico
PCR	- Reação em Cadeia pela Polimerase
°C	- Grau Celsius
NaCl	- Cloreto de sódio
Mm	- Megâmetro
mM	- Micromolar
ML/ml	- Mililitro
Mg	- Miligramas
M	- Molar
Kg	- Quilogramas
K	- Potássio
IDGA	- Imunodifusão em Gel de Ágar
HCl	- Ácido clorídrico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
CO₂	- Gás carbônico
2-ME	- 2-Mercaptoetanol
μm	- Micrômetro
%	- porcentagem
bp	- Pares de base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3. OBJETIVOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Animais	45
4.2 Inoculação Experimental.....	45
4.3 Monitoramento dos Animais	46
4.4 Eutanásia.....	47
4.5 Necropsia.....	47
4.6.Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	48
5. RESULTADOS	51
5.1 Achados Anatomopatológicos	52
5.1.1 Achados Macroscópicos.....	52
5.1.2 Alterações Histopatológicas	54
5.2 Principais achados histopatológicos dos órgãos avaliados nos vários momentos.....	76
5.3 Lesões anatomopatológicas - Presença do agente através da técnica de PCR.....	77
6. DISCUSSÃO	81
6.1 PCR.....	81
6.2 Achados Anatomopatológicos.....	86
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS.....	99

LIRA, N.S.C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepucial e conjuntival simultaneamente.** Botucatu, 2008. 112 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo estudar a patogenia da *Brucella ovis*, em carneiros infectados experimentalmente com a cepa REO 198, tendo por base a presença do agente por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e das alterações anatomopatológicas. Foram utilizados 31 carneiros idades variando de 1-2 anos, desafiados via conjuntival e intraprepucial com uma suspensão contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis*. Os animais foram eutanasiados em duplas, com intervalos de 15 dias até os quatro meses pós-inoculação e mensalmente a partir de então até os doze meses. Em cada necropsia, foram coletados linfonodos (parotídeos, pré-escapulares, faríngeos, mediastinais, mesentéricos, inguinais), glândulas parótidas e mandibulares, pulmões, fígados, baços, rins, epidídimos (cabeça, corpo e cauda), testículos, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais, ampolas do ducto, próstata e bexiga. Todas as amostras de órgãos foram submetidas a PCR e avaliadas histopatologicamente. A presença do agente foi detectada em praticamente todos os tecidos em pelo menos um dos momentos avaliados com predominância no tecido reprodutor. De forma similar as alterações histopatológicas, que embora visualizadas em todos os órgãos predominaram nos órgãos do sistema reprodutor. Hipoplasia de órgãos linfóides e persistência do agente no sistema reprodutivo e urinário foram observadas.

Palavras-chave: *Brucella ovis*, brucelose ovina, inoculação experimental, histopatologia, órgãos, patogenia, PCR.

LIRA, N.S.C. **Anatomopathological lesions and detection of *Brucella ovis* REO 198 strain in rams experimentally infected simultaneously by intrapepucial and intraconjuntival ways.** Botucatu, 2008. 112 p. Thesis (PhD.) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Campus of Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

ABSTRACTS

The aim of this study was the identification of *Brucella ovis* REO 198 strain pathogenic effect in rams experimentally infected. The bacterial detection by PCR and anatomopathological alteration were verified. A total of 31 rams with 1-2 years old were challenged by intraconjuntival and intrapepucial inoculation using a *B. ovis* suspension of 2×10^9 CFU/mL. Each 15 days until 4 months after inoculation two of the rams were submitted to euthanasia. After this time and until 12 months after inoculation the euthanasia were taken monthly. In all necropsies were collected the lymph nodes (parotid, prescapulares, pharyngeal, mediastinal, mesenterics, inguinals), parotids glands, mandibular glands, longs, livers, spleens, kidneys, epididymes (head, body and tail), testicles, seminal vesicles, bulbourethral glands, ampulla ducts, prostates and bladders. All samples were tested by PCR and histopathological techniques. The bacteria was detected in most of all tissues in at least one of the evaluated times of inoculation with the predominance of detection in reproductive tissues. The histo pathological alterations were also observed in all tissues and in the same way showed predominance on reproductive ones. Hypoplasia of the lymphoid system and bacterial presence in reproductive and urinary systems were also observed.

Key words: *Brucella ovis*, Ovine Brucellosis, experimental inoculation, histopathology, tissues, pathogenicity, PCR.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A brucelose ovina, causada por *Brucella ovis*, é uma doença contagiosa de caráter crônico nos ovinos, caracterizada principalmente por alterações nos testículos com conseqüências sobre a fertilidade dos carneiros, diminuindo a eficiência reprodutiva do rebanho e provocando elevadas perdas econômicas (MAGALHÃES NETO e GIL TURNÊS, 1996; ESTEIN, 1999; LÓPEZ et al., 2005).

Inicialmente a doença foi descrita simultaneamente por Buddle e Boyes (1953) na Nova Zelândia e Simmons e Hall (1953) na Austrália. Desde então tem sido constatada em praticamente todos os países onde a ovinocultura tem importância econômica (SPENCER e BURGESS, 1984; ESTEIN, 1999). No Brasil, a infecção foi descrita pela primeira vez por Ramos et al. (1966), porém o primeiro isolamento foi realizado por Blobel et al. (1972). Apesar dos poucos estudos da doença no país, pesquisas têm revelado sua existência em vários estados.

Em inoculações experimentais a enfermidade apresenta um período de incubação que varia entre quatro a seis semanas, caracterizado pela eliminação da bactéria no sêmen (WEBB et al., 1980; QUISPE et al., 2002), por períodos que variam de meses a anos (MANTEROLA et al., 2003).

Experimentalmente, a bactéria tem sido isolada no fígado, nos rins, no baço, no testículo, no epidídimo, na vesícula seminal, na glândula bulbouretral, na ampola do ducto deferente e nos linfonodos ilíacos, pré-escapulares, pré-crurais, submandibulares, parotídeos e retrofaríngeos (FENSTERBANK et al., 1982; BLASCO et al., 1987; MARÍN, 1989).

A *Brucella ovis*, semelhante a outras brucelas, penetra no organismo através das membranas da mucosa (BULGIN et al., 1990). Uma vez que atravessa a mucosa e seguindo o curso dos gânglios linfáticos aferentes, a bactéria chega aos gânglios linfáticos regionais. A partir daí, atinge a corrente sanguínea e invade todo o organismo infectando o trato genital, o fígado, o baço, os pulmões, os rins e outros gânglios linfáticos (BIRBERSTEIN et al., 1964).

No Brasil a ovinocultura encontra-se em expansão. Os rebanhos de ovinos e de caprinos brasileiros estão estimados em cerca de 25,8 milhões de animais. De 1999 a 2002, a produção de carne de ovinos e de caprinos cresceu de 17 mil para 21 mil toneladas/ano, existindo uma proposta da câmara setorial de ovinos/caprinos de fortalecimento do setor e impulsão de seu desenvolvimento em todo país. O Brasil pretende expandir a criação desses animais para atender à crescente demanda interna e diminuir a importação desse tipo de carne, hoje estimada em 50 % do consumo interno. As cadeias produtivas da caprino-ovinocultura respondem pela geração de 55 mil postos de trabalho. O consumo brasileiro é de cerca de 250 mil quilos/mês. O Brasil é o oitavo produtor mundial de ovinos com um total de 14 milhões de cabeças, produzindo anualmente 71 mil toneladas de carne de ovinos (AGECOM, 2006; AGRONLINE, 2008).

A brucelose ovina é uma doença de importância econômica com poucos progressos em seu estudo desde que foi relatada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (MAGALHÃES NETO e GIL TURNÊS, 1996).

Os trabalhos publicados sobre a patogenia da *B. ovis* são escassos e muitas vezes apresentam dados controversos, ficando dúvidas sobre a patogenia da enfermidade. Desta forma, delineou-se o presente experimento com a finalidade de propiciar mais dados para o estudo da brucelose ovina.

Considerando a importância do conhecimento da patogenia da enfermidade, os poucos trabalhos publicados inclusive na literatura internacional e o crescimento da ovinocultura no país, objetivou-se avaliar a patogenia da brucelose ovina, em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*, cepa REO 198.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

A *Brucella ovis*, é uma bactéria de vida intracelular facultativa, Gram-negativos, não capsulados, não esporulados, com tamanho de 0,5 a 0,7 x 0,7 a 1,5 µm, imóveis, que não formam endosporos e não apresentam coloração bipolar (CORBEL et al., 1978, BURGESS, 1982). Seu crescimento ocorre em meios base (Trypticase Soy Agar, Ágar Sangue e Ágar Columbia) enriquecidos com 5 % a 10 % de sangue ou pode ser seletivamente isolada no meio modificado de Thayer-Martim (BROWN et al., 1973; ALTON et al., 1976). Necessita de uma atmosfera de 10 % a 20 % de CO₂ no cultivo primário, embora possa ser isolada cepa CO₂ independente. As colônias tornam-se visíveis após três a cinco dias de incubação em temperatura de 34° C a 37° C, apresentando-se pequenas, circulares, de bordos regulares, opacas de cor variando de branco a marrom (MEYER, 1982; ALTON et al., 1988).

Cinco décadas após o isolamento de *Brucella abortus* em bovinos e sua associação como agente etiológico responsável pelo aborto contagioso nesta espécie (MOCHMANN & KOHLER, 1988; KATIC, 2002), *Brucella ovis* foi isolada pela primeira vez na Nova Zelândia por McFarlane et al. (1952) em ovinos com sinais clínicos de epididimite e aborto.

Simmons e Hall (1953) demonstraram em rebanhos ovinos na Austrália a presença de organismos que na época denominaram de “*Brucella like organism*” e que mais tarde foi re-classificada por Buddle e Boyes (1953) como uma variedade de *Brucella melitensis*.

A “epididimite infecciosa dos ovinos” passou a ser conhecida por *Brucella ovis* a partir de 1956 (BUDDLE, 1956). A enfermidade foi então relatada em reprodutores ovinos na América do Norte por Kennedy et al. (1956); Szyfres e Chappell (1961) e América do Sul por Cedro et al. (1963).

A *Brucella* spp. é composta por uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa (ME) composta por lipossacarídeos (principal antígeno de superfície na maioria das bactérias Gram-negativas) e várias outras proteínas principais. A superfície das bactérias

do gênero *Brucella* spp. varia segundo a fase em que se encontram (lisa ou rugosa). Os lipopolissacarídeos das cepas lisas (LPS-S) são constituídos de lipídeos A ou M, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta denominada cadeia O (MORIYON, 1988). O LPS da cepa rugosa (LPS-R) é basicamente similar ao das lisas, exceto pela ausência da cadeia O (BLASCO, 1990).

No Brasil, a brucelose em ovinos foi observada pela primeira vez no Rio Grande do Sul por Ramos et al. (1966), porém o primeiro isolamento de *Brucella ovis* no Brasil foi realizado por Blobel et al. (1972) neste mesmo estado, tendo sido isolado o agente de oito epidídimos de carneiros que apresentavam lesões clínicas.

A brucelose ovina é uma doença de distribuição mundial que provoca impacto negativo nos países onde a criação de ovinos é uma atividade econômica importante. Nestes países a exploração ovina apresenta baixos índices reprodutivos, alto número de carneiros afetados anualmente, diminuição da vida reprodutiva dos machos, aborto, elevada mortalidade perinatal e conseqüente diminuição dos rendimentos de carne e lã (BURGESS, 1982; ROBLES et al., 1998).

A penetração de *Brucella ovis* pode ocorrer pelas mucosas orais, conjuntivais, prepuciais, vaginais e retais, porém as vias que transmitem naturalmente a doença ainda não são completamente conhecidas (PAOLICCHI, 2001).

Brucella ovis infecta em forma natural a espécie ovina, sendo os machos mais susceptíveis que as fêmeas. Existem algumas raças que são mais resistentes à infecção (TAMAYO et al., 1989); a raça Merino é mais resistente que as britânicas nas condições semelhantes. A resistência genética é importante, sendo que as diferenças na precocidade da atividade sexual, entre outras razões podem ser um aspecto relevante na diferença na suscetibilidade (TIMONEY et al., 1988).

Os ovinos machos infectados são as principais fontes de infecção da enfermidade nos rebanhos. O macho portador, apresentando ou não lesões, pode transmitir a enfermidade para outro carneiro, apenas pelo ato de saltar entre si, hábito comum, observado nesta espécie, favorecendo a entrada de microorganismo pela mucosa retal (sodomia); porém a via oral é a forma de infecção mais comum de macho a macho, por meio da lambertura do prepúcio (BULGIN e ANDERSON, 1983; BULGIN, 1990; PAOLICCHI et al., 1991; NÁREZ et al., 1999; QUISPE et al., 2002; MANAZZA, 2005). A presença de animais soronegativos, que excretam a bactéria no sêmen, favorece a persistência da infecção no rebanho (BULGIN, 1990; MARCO et al., 1994).

A transmissão para as fêmeas ocorre principalmente durante a monta natural, por via venérea (PAOLICCHI et al., 1991), quando um carneiro suscetível copula com uma ovelha que teve previamente no mesmo período do estro, cópula com um carneiro infectado. Desta forma a fêmea atua como fonte de infecção passiva para a transmissão da doença (BROWN et al., 1973). As ovelhas infectadas com *B. ovis*, podem eliminar as bactérias nas secreções vaginais, constituindo um risco para os carneiros durante a cópula (MARCO et al., 1994).

O contágio dos animais virgens se dá freqüentemente em períodos de estabulação prolongada pelo contato com a urina de animais infectados. Nessas condições a bactéria ingressa no organismo pela mucosa nasal, oral, conjuntival e pela via percutânea através de feridas e de escoriações (BROWN et al., 1973; ALTON et al., 1988; BULGIN, 1990).

Os carneiros sexualmente maduros são mais suscetíveis que os animais jovens (WALKER et al., 1986), porém a infecção por *B. ovis* pode ocorrer em animais de até quatro meses de idade (BURGESS, 1982), havendo relatos da infecção com características epizoóticas em rebanhos de carneiros jamais utilizados para reprodução e sem contato com carneiros em reprodução (BULGIN, 1990a).

A infecção experimental em caprinos jovens e adultos demonstrou que esses são menos suscetíveis que os carneiros, sendo que a infecção nestas espécies é de caráter leve e de curta duração (GARCIA-CARRILLO et al., 1974). Por outro lado, não há relatos de que a infecção possa ser transmitida do ovino para o caprino a campo. No homem foram descritas reações sorológicas positivas (MEYER, 1982), porém não há relatos de isolamento desta bactéria (ESTEIN, 1999).

Na Nova Zelândia foi demonstrado que carneiros infectados podem transmitir *B. ovis* em sua forma natural para cervídeos (*Cervus elaphus*) mantidos no mesmo piquete, justificando-se a transmissão por meio da lambadura do prepúcio dos animais ou da contaminação ambiental com o sêmen ou a urina dos animais infectados (RIDLER e WEST, 2002).

A soroprevalência em carneiros dentro dos rebanhos positivos variou de 2,1 a 67 % (SEARGEANT, 1994; TORRES et al., 1997; ROBLES et al., 1998).

A doença foi descrita em diferentes países, dentre eles na Espanha, por Marco et al. (1994), onde foi descrito positividade de 17,8%. Na Austrália por Seargent (1994), que observou 10,8 % de animais positivos. Por Kumar et al. (1997), que examinaram 255 ovinos na Índia, com positividade de 27,8 %. Na Argentina que foi observado um percentual variando entre 4,3 % a 18 % de positividade (DRAGUI-DE-BENITEZ et al. 1984; ROBLES et al. 1993; ESTEIN et al., 2002). No México, variou de 2,4% a 25,9% (TAMAYO et al., 1989; TORRES et al., 1997). No Chile, foi observado 2,8 % de animais positivos (ROJAS et al., 1990).

A existência da brucelose ovina no Brasil foi relatada há muito tempo, em consequência da aquisição de animais procedentes de países, onde havia a doença (RAMOS et al., 1966).

O primeiro estudo sorológico no país foi realizado por Ramos et al. (1966), no Rio Grande do Sul (RS), pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), onde 6,5 % apresentaram positividade. Desde então, vários estudos foram realizados no país. Em São Paulo, Marinho e Mathias (1996),

testaram rebanhos ovinos, não detectando nenhum animal positivo e Nozaki (2003), observou 1,1% de animais positivos em propriedades ovinas no mesmo estado. Em Santa Catarina, Shafer et al. (1997), em seu estudo não observaram nenhum animal positivo. No Rio Grande do Norte a positividade variou de 11,3 % a 34 % (SILVA et al. 2003; AZEVEDO et al., 2004). No Rio de Janeiro, Lima et al. (2007), relataram 3,64 % de positividade.

Em locais que existem programas de controle, a prevalência é mais baixa, entretanto, a erradicação é difícil de ser alcançada (BLASCO, 1990). Desde que foi diagnosticada no Rio Grande do Sul, tem-se encontrado muita dificuldade em controlar a doença, em decorrência das infecções subclínicas (MAGALHÃES NETO e GIL TURNÊS, 1996).

Segundo Ficopal et al. (1998), a infecção pela *B. ovis* tem sido observada em vários carneiros jovens, sugerindo que esses animais, logo após a puberdade poderiam ser altamente suscetíveis. Os animais adultos são comumente os mais infectados naturalmente, porém observa-se que a incidência de alterações testiculares e a sorologia positiva para brucelose, aumentam de acordo com a idade e a atividade sexual.

A diminuição na qualidade do sêmen também foi estudada por vários autores, onde foi observada a redução na produção total de esperma, baixa motilidade e alto percentual de anormalidades morfológicas (CAMERON e LAUERMAN JR, 1976).

Segundo Liautard et al. (1996) independente da via natural de transmissão, a infecção por *Brucella* spp. requer quatro etapas distintas, ou seja, aderência, invasão, estabelecimento da infecção e disseminação.

A penetração de *B. ovis* no organismo, dos ovinos pode ocorrer pela mucosa conjuntival (GRILLÓ et al., 1999), prepucial (PLANT et al., 1986; MANTEROLA et al., 2003), retal, nasal (PLANT et al., 1986), oral (ALTON et al., 1988) e através da pele lesionada (NILSEN e DUNCAN, 1990).

B. ovis, semelhante a outros organismos tem a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos, o que favorece a persistência do agente nos tecidos (PAOLICCHI, 2001). Após a penetração, geralmente através da mucosa, a *B. ovis* coloniza os linfonodos regionais, produz bacteremia e finalmente coloniza o trato genital por volta de 30 dias (BIBERSTEIN et al., 1964).

Existe um longo período de latência antes dos sinais clínicos tornarem-se evidentes, assim como as infecções causadas por outras brucelas (THOEN e ENRIGHT, 1986). Sob condições experimentais, pela via conjuntival, nasal ou oral, o agente permanece confinado próximo aos locais de entrada, por duas ou três semanas e então ocorre bacteremia, seguido de infecção do sistema fagocítico mononuclear e linfonodos mais distanciados, como os dos órgãos genitais e das glândulas acessórias (FENSTERBANK et al., 1982; BLASCO et al., 1987; MARÍN, 1989).

O carneiro infectado constitui a principal fonte de infecção do rebanho, sendo o sêmen a principal via de eliminação. A liberação da bactéria no sêmen ocorre de forma intermitente e por períodos prolongados (WORTHINGTON et al., 1985; PAOLICCHI et al., 1991), relatando-se cultivos positivos até 80 semanas pós-infecção experimental (PAOLICCHI et al., 1991).

Os fatores determinantes do tropismo da *B. ovis* pelos órgãos sexuais ainda não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que o metabolismo do ferro pela bactéria seja um importante fator, já que para *B. ovis* o eritritol não deve ser levado em consideração (REDWOOD e CORBEL, 1983).

A infecção experimental por *B. ovis* pode ser estabelecida após exposição de ovinos suscetíveis à cultura pura da bactéria ou ao sêmen contaminado por via prepucial, retal ou nasal (LAWS et al., 1972; PLANT et al., 1986).

Em trabalho realizado por Nozaki (2008), em carneiros infectados experimentalmente, foi avaliada a presença de *Brucella ovis* através das técnicas da PCR e do cultivo microbiológico de urina e sêmen. A presença do agente, por PCR, foi detectada em sêmen, em todos os momentos, predominantemente nos dois primeiros meses enquanto que na urina iniciou-se aos 15 dias persistindo até os seis meses após a inoculação. No entanto, o agente foi também isolado por meio de cultivo bacteriano nestas mesmas excreções, em sêmen, aos sete dias pós-inoculação de forma esporádica em todos os períodos e em urina foi isolada com maior frequência no período inicial até os dois meses pós-inoculação, ocorrendo o isolamento em todos os períodos até o final do experimento também de forma intermitente.

Infecção por inoculações experimentais tem sido realizada em vários estudos. BIBERSTEIN et al. (1964) realizaram um estudo da patogenia da epididimite em 48 carneiros, que foram infectados experimentalmente por via conjuntival. As primeiras lesões foram observadas durante o segundo mês após a inoculação, na cauda do epidídimo, na vesícula seminal e na ampola. Após dois meses, também foi observada bacteremia em outros órgãos, incluindo fígado, baço e rins.

Em outros estudos experimentais, a bactéria tem sido isolada no fígado, nos rins, no baço, no testículo, no epidídimo, na vesícula seminal, na glândula bulbouretral, nas ampolas e nos linfonodos ilíaco, pré-escapulares, pré-crural, submaxilar, parotídeo e retrofaríngeos (FENSTERBANK et al., 1982; BLASCO et al., 1987; MARÍN, 1989).

Os principais órgãos afetados são os epidídimos e as glândulas sexuais acessórias na maioria dos carneiros. Nos animais sorologicamente positivos, geralmente o cultivo da *Brucella ovis* é negativo, mas a bactéria pode estar localizada em outros órgãos. Esta hipótese é consistente com o isolamento de *B. ovis* do baço e dos linfonodos ilíacos de alguns animais experimentalmente infectados, nos quais *Brucella* spp. foi isolada de órgãos genitais e das glândulas acessórias sexuais (BLASCO et al., 1987; MARÍN, 1989).

No aparelho reprodutor masculino de ovinos, *Brucella* spp. pode levar à reação inflamatória do tipo necrosante na vesícula seminal, nos testículos e no epidídimo, com conseqüente aumento de volume uni ou bilateral, provocando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade. Como seqüela pode haver atrofia do órgão afetado (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986).

Vários estudos foram realizados enfocando a patologia da infecção pelas diferentes espécies de *Brucella* spp.

Segundo Gorvel e Moreno (2002), as bactérias do gênero *Brucella* spp. são usualmente classificadas como parasitas intracelulares facultativos. No entanto, alguns autores consideram que a melhor classificação seria a de parasitas intracelulares facultativamente extracelulares devido à preferência desses microorganismos pelo meio intracelular. Ao contrário das outras bactérias patogênicas, fatores clássicos de virulência como exotoxinas, flagelos, fímbrias, cápsulas e outros não são encontrados em *Brucella* spp. Os fatores envolvidos com a patogenicidade são aqueles que permitem a invasão, a sobrevivência e a multiplicação intracelular nas células do hospedeiro.

As bactérias do gênero *Brucella* spp., podem infectar fagócitos e células não fagocíticas *in vivo* e *in vitro* (DETILLEUX et al., 1990; PIZZARRO-CERDÁ et al., 1998). Após a invasão das mucosas, as bactérias opsonizadas e não opsonizadas, não são interligadas pelos fagócitos que estão localizados na submucosa (GORVEL e MORENO, 2002).

De acordo com a rota primária da transmissão natural das várias espécies da *Brucella* spp. que infectam os animais domésticos, os organismos devem possuir a habilidade de atacar as superfícies mucosas e devem ser capazes de estabelecer um nicho e penetrar o epitélio da membrana mucosa. Numerosos estudos documentaram a habilidade de muitas espécies de brucela invadirem as mucosas conjuntival, oral, faríngea, intestinal, respiratória, vaginal e prepucial (OLITZKI, 1970).

Os agentes invasores que escapam das defesas da submucosa são distribuídos para os linfonodos regionais pela drenagem linfática. Não se sabe se *Brucella* spp. que colonizam os linfonodos regionais são carregadas para os linfonodos dentro de células fagocíticas ou os alcançam como organismos livres. Cepas de desafio de *B. abortus* foram isoladas de linfonodos parotídeos, entre dois a quatro dias, após o desafio conjuntival (ENRIGHT, 1990).

Em um estudo da patogenia da infecção por *Brucella abortus* em bovinos, 11 vacas gestantes, com idades variando entre 4,5 a 13,5 anos, foram inoculadas no saco conjuntival direito com $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *B. abortus* cepa 544. Estas vacas foram abatidas em intervalos semanais após o desafio e alguns tecidos coletados, cultivados e examinados histologicamente. O linfonodo parotídeo, responsável pela drenagem linfática do olho continha 10^5 UFC de *B. abortus* por grama de tecido, oito dias após a inoculação. O número de *B. abortus* recuperada deste linfonodo variou individualmente entre as vacas nos 45 dias após a inoculação; o isolamento da *Brucella* spp. foi obtido principalmente nos linfonodos, sendo os linfonodos submandibulares, os que apresentaram isolamento bacteriano em 90,1 % dos animais examinados. O número de *Brucella* spp. presente nestes linfonodos variou de 10^2 UFC/g em oito dias para um pico de 10^5 UFC/g em 15 e 22 dias após a inoculação. Após estes períodos um menor número de brucela foi isolada. Apesar do pequeno número de vacas examinadas, este estudo sugeriu que grandes quantidades de bactéria (UFC por grama de tecido), poderiam ser encontradas nos linfonodos que drenam os locais da inoculação. O baixo número inicial de brucela infectando os linfonodos que drenam a cavidade oral sugere que poucas bactérias teriam acesso à mucosa nasal e posteriormente, à mucosa oral pelo ducto lacrimal (PAYNE, 1959; NILSEN e DUNCAN, 1990).

Em outros estudos, foi demonstrado ser necessário um período maior que quatro semanas, para colonização da bactéria nos linfonodos que drenam a mucosa oral, se a infecção for por via oral, porém houve uma diminuição na quantidade de bactérias existentes nos linfonodos mais distantes dos locais da inoculação. Sendo assim, sugeriu-se que quanto maior o número

de bactérias que inicialmente colonizam o linfonodo, maior a chance de persistência prolongada da infecção nesses locais. As brucelas foram isoladas dos linfonodos faríngeos em 36,4 % dos animais examinados e a infecção não foi detectada nos linfonodos mediastinos de nenhum dos animais estudados. Observou-se que a colonização dos linfonodos que drenam as mucosas situadas mais distalmente ao local de infecção inicial foi devido à invasão secundária da mucosa, sendo assim tais estudos sugerem que cada vez menos as brucelas estão viáveis para atravessar a barreira da mucosa (ENRIGHT, 1990).

Os linfonodos infectados normalmente estão aumentados devido à hiperplasia linfóide e reticuloendotelial e também a infiltração das células inflamatórias. Sendo assim, múltiplas áreas de hemorragia estão presentes dentro dos linfonodos infectados por uma a duas semanas após a inoculação. Múltiplos focos de hematopoiese extra medulares adjacentes aos folículos linfóides são freqüentemente observados durante a primeira semana pós infecção. Tanto os precursores celulares eosinofílicos quanto os neutrofílicos são observados nesses focos (CHEERS e YOUNG, 1987).

Davis et al. (1990), estudando brucelose em bovinos expostos a *B. abortus* por via conjuntival, observaram por meio do cultivo microbiológico a presença do agente no linfonodo parotídeo nas duas, três, quatro, cinco e seis semanas pós-inoculação correlacionado com a porta de entrada.

Quatro dias após a inoculação, já foram observados focos de infiltrados inflamatórios, particularmente, dentro do córtex dos linfonodos. Estas reações inflamatórias eram compostas por macrófagos e células epitelióides (THOEN e ENRIGHT, 1986). Também foram observados grandes números de neutrófilos e de eosinófilos maduros dentro vasos sanguíneos de pequeno calibre, nos linfonodos e na cápsula. O tecido que circundava esses vasos também estava composto por estas células inflamatórias (NILSEN e DUNCAN, 1990).

Recentemente, em um estudo realizado com infecção experimental de *Brucella melitensis* em ratos de laboratório, foi observada a bactéria nas glândulas salivares. A presença do agente neste local sugeriu uma via importante de penetração, particularmente na infecção em humanos, pois a via oral é a principal via de infecção na espécie humana (RAJASHEKARA et al. 2005).

No caso da *Brucella canis*, a barreira da mucosa representa a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção pela *Brucella* spp. As reações inflamatórias que ocorrem nos tecidos submucosos e dentro do linfonodo que drena o local de infecção são a segunda e terceira linhas de defesa do hospedeiro. Quando não há destruição de *B. canis* no linfonodo que drena a região próxima a entrada da bactéria, pode haver uma persistência da infecção e eventual fuga do agente para o sangue. As bactérias do gênero *Brucella* spp. são capazes de sobreviver dentro dos leucócitos do hospedeiro e podem utilizar os neutrófilos e macrófagos para se protegerem dos mecanismos bactericidas humoral e celular durante os períodos de difusão hematogena (CARMICHAEL e KENNEY, 1970).

Durante a fase de bacteremia, as bactérias do gênero *Brucella* spp. podem se localizar em uma grande variedade de tecidos. Contudo, as bactérias são mais freqüentemente isoladas de tecidos linfóides, da glândula mamária e do aparelho reprodutivo. As infecções podem ainda se estabelecer em ossos, articulações, olhos e ocasionalmente, no cérebro. Em machos, as localizações secundárias ocorrem mais freqüentemente nos linfonodos, nos testículos, no epidídimo e nos órgãos sexuais acessórios. Em geral, as espécies de brucela que são mais comumente associadas com períodos de bacteremia prolongados, *B. suis* e *B. canis*, são também conhecidas por sua predisposição em se localizar em locais secundários (THOEN e ENRIGHT, 1986).

Na brucelose ovina, a infecção crônica é caracterizada clinicamente, por epididimite, orquite e infertilidade nos machos (FICAPAL et al., 1998).

Macroscopicamente os testículos apresentam-se normal, mas pode-se perceber granulomas e calcificação. Quando há interrupção da espermatogênese pode haver atrofia testicular (FOSTER et al., 1987), sendo essa uma característica na fase crônica da doença (BADIOLA et al., 1982).

Normalmente o epidídimo afetado apresenta-se firme e com superfície esbranquiçada ao corte, em consequência da proliferação do tecido conjuntivo. A cauda do epidídimo é o local em que se observa maior alteração, sendo unilateral em sua maioria e caracterizada por consistência firme, sem aumento considerável de volume na maioria dos casos. O aumento da cauda do epidídimo caracteriza cronicidade da doença (CAMERON e LAUERMAN JR., 1976; BADIOLA et al., 1982; SEARSON, 1987; FOSTER et al., 1989; BLASCO, 1990; WEST et al., 1993). Alterações macroscópicas geralmente são observadas nos epidídimos apenas após a formação de granulomas espermáticos (FOSTER et al., 1987). Em função da epididimite, a qualidade do sêmen e fertilidade dos animais encontram-se alteradas (KOTT et al., 1988; ROBLES et al., 1998; BULGIN et al., 1990).

As vesículas seminais podem apresentar aumento de volume com ductos preenchidos por líquidos. As glândulas bulbouretrais, a próstata e as ampolas seminais normalmente não apresentam alterações significativas (FOSTER et al., 1987).

Em um estudo das alterações do sistema genital de 845 carneiros, descartados do programa de reprodução em 17 fazendas australianas, a epididimite foi a alteração mais freqüente observada entre as patologias de importância clínica, sendo que a maioria dos animais que apresentava epididimite era também sorologicamente positivo para *B. ovis* (FOSTER et al., 1989). No carneiro, as lesões resultantes da infecção por *B. ovis*, com confirmação bacteriológica, concentram-se principalmente na cauda do epidídimo, mas também ocorrem na ampola do ducto deferente e na glândula vesicular, sendo que em 70% dos casos a lesão é bilateral (SEARSON, 1987).

Embora *B. ovis* cause epididimite, existem carneiros infectados que não desenvolvem a doença perceptível à palpação. Em um experimento com 267 carneiros positivos, apenas 125 apresentaram alterações testiculares detectáveis à palpação (BLASCO, 1986). Mesmo entre esses animais que mostraram alterações testiculares ao exame histológico, uma importante proporção de carneiros infectados por *B. ovis* não apresentam lesões escrotais. Na maioria dos casos, a localização da lesão testicular é unilateral. O epidídimo é o local mais comum, sendo a cabeça e o corpo freqüentemente mais afetados (BLASCO, 1990).

Microscopicamente, a localização inicial no epidídimo é acompanhada por edema perivascular e infiltração dos linfócitos, dos monócitos e dos neutrófilos. Logo após, o epitélio tubular inflamado desenvolve uma hiperplasia papilar e degeneração hidrópica local com formação de cistos intraepiteliais. A destruição epitelial tanto pela bactéria como pela reação inflamatória, leva a um extravasamento de espermatozóides. A resposta do hospedeiro ao espermatozóide extravasado, leva a formação de um granuloma espermático que pode bloquear completamente o epidídimo, com posterior degeneração e fibrose (THOEN e ENRIGHT, 1986; FOSTER et al., 1987).

Após a inoculação experimental de cultura de *B. ovis*, diretamente no epidídimo, observou-se intenso infiltrado inflamatório misto, constituído por linfócitos e neutrófilos detectável aos quatro dias após a inoculação. Aos oito dias após a inoculação, além de infiltração de células inflamatórias no tecido conjuntivo de sustentação e no epitélio epididimário, observaram-se acúmulo de grande quantidade de neutrófilos no lúmen epididimário. As lesões iniciais progridem com fibrose intersticial, degeneração do epitélio epididimário (SANTOS et al., 2005) e eventualmente ruptura do ducto epididimário com extravasamento de espermatozóides para o interstício e desenvolvimento de granuloma espermático (PAOLICCHI, 2001).

Na formação dos granulomas espermáticos, carneiros infectados com *B. ovis*, normalmente desenvolvem reação imune espermática, que persiste mesmo após tratamento seguido de cura bacteriológica e, portanto, pode ter significado na patogênese da infertilidade associada à

infecção por *B. ovis* (PAOLICCHI et al., 2000). Essas lesões, no entanto, não são específicas para *B. ovis* (SANTOS et al. 2005).

Em um estudo realizado na Nova Zelândia, West et al. (1993), observaram que três, dos 36 animais estudados apresentaram epididimite caracterizada por hiperplasia epitelial moderada em alguns túbulos na cauda do epidídimo. Em outros dois animais houve a formação de cistos intraepiteliais acompanhados de hiperplasia do epitélio epididimal característico da epididimite por *Brucella ovis*. Foram observados também muitos cistos contendo neutrófilos e áreas necrosadas com presença de leucócitos. Um pequeno número de linfócitos pode ser visto na base do interstício do epitélio de órgãos linfóides agregados e subjacentes ao interstício de três, dos quatro animais.

Em um estudo realizado na Argentina por Garcia-Carrillo et al. (1974) foi descrito que no exame histopatológico 37,5 % dos carneiros expostos à inoculação, apresentaram epididimite. A intensidade da lesão inflamatória foi menor que nos animais expostos a infecção natural. Não se observou infiltrado inflamatório intenso denso e nem reação inflamatória intensa, tal como ocorre nos casos de longa evolução. A infecção experimental em carneiros demonstrou que a ocorrência de epididimite não é constante, portanto, a denominação “epididimite ovina” pode não ser adequada. Já que podem existir lesões testiculares muito severas com a ausência de lesões no epidídimo. Um dos animais do estudo apresentou reação positiva em repetidas provas sorológicas, havendo lesões histopatológicas severas no testículo e nenhuma lesão no epidídimo, tendo sido isolado o agente nesse mesmo animal.

Em um trabalho desenvolvido na Austrália por Foster et al. (1987) foram inoculados 35 animais em que se isolou *B. ovis* do sêmen de 25 deles. Foram coletados ducto deferente, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, vasos deferentes, ampola, vesícula seminal, glândula bulbo uretral e uretra pélvica. As lesões microscópicas da glândula acessória sexual, somente foram visualizadas na ampola e na vesícula seminal e consistiram de infiltração de

macrófagos, de linfócitos, de plasmócitos, e de neutrófilos não somente no estroma, mas também no epitélio.

A atrofia testicular deriva do processo regressivo do epitélio testicular e da suspensão da espermatogênese. Pode ocorrer também, proliferação do tecido conectivo intertubular, pequeno granuloma espermático extratubular e necrose de calcificação dos túbulos seminíferos (BIRBERSTEIN et al., 1964; BADIOLA et al., 1982; MEYER, 1982; RAHALEY e DENNIS, 1984; BLASCO et al. 1987; MARÍN, 1989).

As principais alterações microscópicas das vesículas seminais são representadas por infiltrados de linfócitos e de plasmócitos, fibrose e hiperplasia epitelial difusa com cistos intraepiteliais contendo neutrófilos (BIRBERSTEIN et al., 1964; BLASCO, 1986; FOSTER et al., 1987).

Na glândula bulbouretral e na ampola do ducto deferente são observadas apenas lesões microscópicas caracterizadas pelo acúmulo de células inflamatórias (FOSTER et al., 1987). (FAZER LINK)

West et al. (1993), descreveram que todos os animais apresentavam alterações histopatológicas na vesícula seminal, sendo observado principalmente denso infiltrado focal e grande quantidade de linfócitos, com pequena quantidade de células plasmáticas e ocasionalmente alguns neutrófilos observados no interstício dos túbulos da vesícula seminal. Alguns infiltrados inflamatórios foram associados com áreas de hiperplasia epitelial, acúmulo de leucócitos e de debris necrótico em sua lâmina tubular.

De acordo com Jansen (1980), que estudou 100 animais da raça Merino e da Dorper, infectados naturalmente na África, a vesícula seminal de alguns carneiros, mostrou-se aumentada de tamanho e com aspecto lobular, sendo que na maioria dos carneiros a vesícula seminal não apresentou alteração. Foster et al. (1987) relataram que as vesículas seminais podem apresentar aumento de volume com ductos preenchidos por líquidos.

A inflamação nas ampolas está relacionada à epididimite. Hiperplasias focais com cistos intraepiteliais vazios e acúmulos de neutrófilos

no lúmen das dilatações do epitélio são observadas com freqüência. O acúmulo de células redondas e de fibrose podem ser visualizados na lâmina própria (FOSTER et al. 1987; MARÍN et al., 1989). Jansen (1980) relataram que as ampolas dos animais em seu experimento não apresentaram alteração.

O exame microscópico da próstata e da glândula bulbouretral revela uma discreta infiltração de células redondas e hipertrofia glandular focal (MARÍN et al., 1989), porém segundo Foster et al. (1987) as glândulas bulbouretrais e a próstata, normalmente não apresentam alterações significativas.

A palpação escrotal em carneiros tem demonstrado ser uma técnica de grande utilidade no diagnóstico da epididimite ovina. A identificação do número elevado de machos, que a palpação, demonstraram epididimite unilateral ou bilateral, sugere a possibilidade de infecção no rebanho (LAWRENCE, 1961). Porém esse procedimento tem eficácia limitada, visto que existem animais que, embora infectados, não desenvolvem lesões, além disso, as lesões que evoluem para cronicidade podem não ser perceptíveis à palpação ou ainda, a existência de outras causas infecciosas ou não, capazes de provocar lesões no epidídimo (McGOWAN e SCHULTZ, 1956; HUGHES e CLAXTON, 1968).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

- Estudar a patogenia da brucelose em carneiros inoculados experimentalmente com *B. ovis* REO 198.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a disseminação e persistência do agente nos diferentes órgãos após a infecção experimental.
- Avaliar as alterações anatomopatológicas observada nos órgãos dos ovinos inoculados experimentalmente.
- Associar as alterações anatomopatológicas com a presença do agente nos diferentes órgãos.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu, no período de 2005-2007.

Todos os animais utilizados neste experimento foram examinados antes de serem introduzidos ao estudo. Foi realizado exame clínico através da palpação escrotal, avaliação espermática através da colheita do sêmen, sorologia para *B. ovis* através da prova de IDGA e cultivo microbiológico de sangue, sêmen e urina para descartar a possibilidade destes animais estarem infectados pela *B. ovis*.

4.1 Animais

Foram utilizados 31 ovinos machos de raça Santa Inês com um a dois anos de idade, provenientes de propriedades comerciais, localizadas no Estado de São Paulo. Esses animais foram mantidos em baias no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

A utilização dos animais para este experimento foi aprovada pela comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho.

4.2 Inoculação Experimental

A cepa utilizada foi a *Brucella ovis* REO 198, liofilizada, obtida do Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”. FEPAGRO – Eldorado do Sul/RS. Após suspensão da cepa, este material foi cultivado em meios de cultivo seletivo Thayer Martin, em atmosfera de CO₂, por três a cinco dias. Após o crescimento da bactéria, foi preparada uma suspensão bacteriana contendo 2×10^9 UFC/mL de *B. ovis* (BLASCO, 1990). Em seguida, os animais foram desafiados com 2 mL pela via intrapreucial e 50 µL pela via conjuntival de suspensão bacteriana simultaneamente.

4.3 Monitoramento dos Animais

4.3.1 Colheita e obtenção do soro

De todos os carneiros foi colhido sangue semanalmente, para a realização do diagnóstico sorológico durante os 12 meses do experimento. A colheita do material foi realizada após assepsia local, com álcool iodado. O sangue foi colhido através de venopunção jugular, utilizando-se sistema a vácuo estéril sem anticoagulante¹, com agulha 25 x 7 MM, retirando-se, aproximadamente, 10 mL de sangue por animal. Esse material foi mantido em posição de descanso por, no máximo, 12 horas, para a formação do coágulo, visando à obtenção do soro.

Após a retração do coágulo e a liberação do soro, as amostras foram identificadas, aliquotadas em tubos de polipropileno² e conservadas em freezer (-20 °C), para a realização da prova sorológica.

4.3.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella ovis* - Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Para a realização da IDGA foi utilizado protocolo de acordo com as recomendações do Instituto Tecnológico do Paraná – TECPAR), responsável pela produção do antígeno.

As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas, utilizando sistema de iluminação com luz indireta e fundo preto. O resultado final foi obtido na leitura de 72 horas.

4.4 Eutanásia

Realizou-se a eutanásia de um animal 15 dias pós-inoculação e dos 30 aos 105 dias foram eutanasiados dois animais a cada 15 dias, em seguida dois animais mensalmente dos quatro aos 12 meses pós-inoculação.

¹ Tubos BD Vacutainer

² Tubos de polipropileno, Eppendorf

Os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia de acordo com as normas que estabelecem os métodos aceitáveis (ANDREWS et al., 1993).

4.5 Necropsia

O exame necroscópico foi realizado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, na UNESP-Botucatu, em que foram observadas, principalmente, as alterações macroscópicas relacionadas ao aparelho reprodutor desses animais.

Durante a necropsia foi realizada colheita dos linfonodos (parotídeo, pré-escapular, faríngeo, mediastino, mesentérico, inguinal), das glândulas parótidas e mandibulares, dos pulmões, do fígado, do baço, dos rins, dos epidídimos, dos testículos, da vesícula seminal, das glândulas bulbouretrais, da ampola do ducto, da próstata e da bexiga.

4.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.6.1 Obtenção e preparação das amostras para PCR

Dos animais submetidos a eutanásia, foram colhidos e macerados no mesmo dia fragmentos de linfonodos (parotídeo, pré-escapular, faríngeo, mediastínico, mesentérico, inguinal), das glândulas parótidas e mandibulares, dos pulmões, do fígado, do baço, dos rins, da bexiga, os epidídimos, dos testículos, da vesícula seminal, da glândula bulbo-uretral e da ampola, para realização da PCR. Os fragmentos dos órgãos colhidos foram macerados individualmente, com êmbolos de vidro, em placa de Petri descartável, estéril com 1 mL de solução fisiológica estéril. Os macerados foram aliquotados em polipropileno³ e mantidos a -20 °C para realização da PCR.

³ Tubos de polipropileno, Eppendorf

Foi realizado pool de cada órgão, de cada dupla, por quinzena até os quatro meses e em seguida pool mensal das duplas até os doze meses. O macerado resultante do pool de cada órgão de cada dupla de animal eutanasiado em cada etapa foi utilizado na PCR.

4.6.2 Extração do DNA das amostras

Amostras de macerados de órgãos (aproximadamente 200 µL) foram descongeladas e adicionadas em 800 µL tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), respectivamente e centrifugadas a 13000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as lavagens repetidas por 3-4 vezes até que o sobrenadante ficasse límpido.

Após as lavagens, o precipitado foi suspenso com 350 µL da solução (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl), com incubação a 80 °C por 10 min. e acréscimo posterior de 50 µL da solução (1 % SDS e 12 µL proteinase K 20 mg/mL). A incubação foi realizada a 37 °C por 24 h. A fase aquosa contendo o ácido nucléico foi extraída utilizando o método de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (BAILY et al., 1992; CORTEZ et al., 2001; KEID, 2001).

O “pellet” final foi suspenso com 60 µL de TE pH 8,0 e incubados a 56 °C por 30 min. O material foi estocado a – 20 °C até o momento da reação.

4.6.3 Amplificação

Os *primers* utilizados foram o ISP1 e ISP2, designados para a seqüência de nucleotídeo da *Brucella* IS 6501 (ISP1 F: 5´-GGTTGTTAAAGGAGAACAGC – 3´ e ISP2 R: 5´-GACGATAGCGTTTCAACTTG – 3´) (MANTEROLA et al., 2003).

O mix para reação de PCR foi realizado com base em Keid et al. (2007), constituindo um volume final de 25 µL, por tampão de reação 1X,

200 μM de cada dNTP, 2,5 μL de cada *primer* (10 pmol/ μL), 1 mM MgCl_2 , 5 U/ μL *Taq* platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5 μL do DNA extraído. O processo de amplificação foi realizado segundo protocolo já relatado (MANTEROLA et al., 2003). Água ultra pura foi utilizada como controle negativo e colônia pura de *B. ovis* como controle positivo.

A análise do produto amplificado foi realizada utilizando-se a técnica da eletroforese em gel de agarose a 2 % (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M Tris-borato e 1 mM EDTA, pH 8.0). As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular sendo consideradas positivas aquelas com peso molecular aproximado de 700 bp.

4.6.4 Extração de DNA para controle positivo

Para extração do DNA da bactéria, utilizou-se a cultura pura de *B. ovis*. Com ajuda de uma alça descartável estéril, colheu-se uma porção da colônia e adicionou-se em 400 μL tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0.

Amostras de órgãos macerados (aproximadamente 500 μL) foram descongeladas e adicionadas a 500 μL tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), as amostras foram incubadas a 80 °C por 10min. Posterior centrifugação foi realizada a 13000 x g por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e foram realizadas lavagens repetidas por 2-3 vezes, até que o sobrenadante ficasse límpido. Para amostras extraídas foi utilizado protocolo já descrito (KEID,2007).

Após as lavagens, o precipitado foi ressuspendido com 500 μL tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 constituído por 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 μL SDS 10% e 10 μL proteinase K (20mg/mL). Incubação posterior foi realizada a 37 °C por 24 h. A fase aquosa contendo o ácido nucléico foi extraída utilizando o método de fenol/clorofórmio/álcool/isoamil (BAILY et al., 1992; CORTEZ et al., 2001; KEID, 2001).O “pellet” final foi suspendido com 30 μL de TE pH 8,0 e incubados a 56 °C por 30 min. O material foi estocado a -20 °C até o momento da reação.

4.7 Exame Histopatológico

O processamento histopatológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp – Botucatu.

Os fragmentos dos órgãos colhidos na necropsia foram acondicionados em frascos de boca larga, contendo solução de formalina neutra e tamponada a 10 % para fixação. Posteriormente, foram cortados fragmentos de \pm 0,5 cm de largura, colocados em cassetes plásticos, identificados e processados em álcool a 70 %, 80 %, 95 %, álcool absoluto, xilol para diafanização e inclusão em parafina.

Após esta etapa os fragmentos foram incluídos em bloco de parafina, cortados em micrótomo com 3 a 6 μ m de espessura e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina, para observação em microscópio óptico (PROPHET et al., 1992).

Resultados

5. RESULTADOS

A comprovação da infecção nos animais foi obtida por meio de sorologia e pela presença do agente através da PCR. Todos os animais com exceção dos: 01 (15 dias), 02 e 04 (30 dias), 05 (45 dias), 07 (60 dias), 08 e 09 (75 dias) e 12 (6 meses), apresentaram sorologia positiva em algum momento pós-inoculação.

A presença da bactéria foi detectada por PCR dos 15 dias pós-inoculação até o momento da última coleta, em pelo menos um dos órgãos de todos os animais e em pelo menos um dos momentos pós-inoculação. O único tecido em que não se detectou DNA bacteriano em nenhum dos períodos foi o linfonodo faríngeo. Os órgãos, os tecidos e os momentos em que onde foram detectados DNA bacteriano estão apresentados no quadro 1.

Quadro 01 – Presença de *B. ovis* evidenciada por PCR em órgãos de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, Botucatu.

Órgão/Tempo	15d	30d	45d	60d	75d	90d	105d	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
L. Parotídeo			■						■							
L. Faríngeo																
L. Pré-Escapular						■										
L. Mediastinal				■									■			
L. Mesenterico															■	
L. Inguinal	■	■	■			■		■		■						
G.Parót./Mandib.			■		■	■								■		
Baço								■		■						
Fígado										■	■					
Pulmão						■								■		
Rim				■							■	■				
Bexiga	■	■				■			■	■				■	■	■
Testículo D.			■											■	■	■
Testículo E.			■	■										■		
Epidídimo D.			■	■	■						■				■	■
Epidídimo E.																■
Vesícula Seminal			■			■			■	■			■	■	■	■
G. Bulbouretral											■	■			■	
Ampola				■	■										■	
Próstata			■	■	■						■			■	■	

G. Parót./Madib. – Glândula Parótida/ Glândula Mandibular; D - Direito; E -Esquerdo; L - Linfonodo; G -Glândula



5.1 Achados Anatomopatológicos

5.1.1 Achados Macroscópicos

A principal alteração anatomopatológica nos linfonodos parotídeos, pré-escapulares, faríngeos, mediastinais, mesentéricos e inguinais estudados, foi aumento de tamanho aos 45 dias, quatro, cinco e dez meses pós-inoculação.

Nas glândulas parótidas não houveram alterações macroscópicas. Nas glândulas mandibulares de um dos animais aos seis meses pós-inoculação a alteração encontrada foi hipertrofia.

No baço de um dos animais examinados ocorreu congestão aos quatro meses pós-inoculação. Aos seis meses o baço de um dos animais apresentou bordas finas e assimétricas e aos dez meses pós-inoculação um dos animais apresentou baço diminuído de tamanho.

Em alguns dos pulmões examinados foram observadas as seguintes alterações: congestão e hemorragias petequiais, aos quatro meses pós-inoculação; exsudato seroso e edema pulmonar aos sete e oito meses pós-inoculação e presença de nódulos com áreas hemorrágicas aos 11 meses pós-inoculação.

Em um dos animais estudados (45 dias pós-inoculação), foi visualizado na bexiga presença exsudato mucopurulento. Em outro animal, quatro meses pós-inoculação, observou-se hemorragias petequiais na mucosa. Nos testículos, ocorreu hipertrofia em um dos animais aos quatro meses pós-inoculação e áreas de calcificação em outro animal aos seis meses pós-inoculação. O corpo do epidídimo de um dos animais aos 90 dias pós-inoculação apresentou aumento do testículo direito e hemorragia em forma de sufusões. Na cabeça, no corpo e na cauda do epidídimo desse mesmo animal, foi observado hipertrofia (Figuras 1 e 2). Aos quatro meses pós-inoculação, a cabeça de um dos epidídimos avaliados apresentou hipertrofia, abscessos e presença de líquido

purulento ao corte. Em outro animal aos 11 meses pós-inoculação a cabeça do epidídimo apresentava-se com consistência firme e resistente ao corte. Nos rins, no fígado, vesículas seminais, na ampola e próstata não foram observadas alterações dignas de nota.



Figura 1. Testículo do carneiro aos 90 dias pós-inoculação, apresentando testículo direito maior que o esquerdo e cauda do epidídimo aumentada de tamanho.



Figura 2. Epidídimo do carneiro aos 90 dias pós-inoculação, apresentando cauda aumentada de tamanho e hemorragia no epidídimo direito.

5.1.2 Alterações Histopatológicas

O exame histopatológico foi realizado em todos os órgãos coletados na necropsia.

5.1.2.1 Linfonodos

Nos linfonodos parotídeos, pré-escapulares, faríngeos, mediastinais, mesentéricos e inguinais, houve predominância de rarefação linfóide (90,3 %) e edema na medular (48,4 %) (Figura 3.a) evidente em praticamente todos os períodos pós-inoculação, conforme observado na tabela 1.

5.1.2.2 Glândula Parótida

Na glândula parótida, 80,6% dos animais não apresentaram alterações histopatológicas. Foi observado num mesmo percentual (3,23 %), degeneração hidrópica do epitélio do ducto aos 15 dias, infiltrado mononuclear multifocal discreto aos 90 dias, infiltrado mononuclear focal moderado aos 105 dias, infiltrado mononuclear focal discreto aos seis meses e focos de calcificação aos dez meses pós-inoculação. As alterações podem ser observadas na tabela 2.

5.1.2.3 Glândula Mandibular

Na glândula mandibular, 80,6% dos animais não apresentaram alterações histopatológicas. Das alterações que foram descritas houve predominância de infiltrado mononuclear focal discreto (12,9 %) que ocorreu aos cinco e sete meses pós-inoculação, além de hiperplasia aos 15 dias pós-inoculação e congestão, aos nove meses pós-inoculação ambas ocorreram em 3,23 % dos animais. As alterações podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 1- Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos linfonodos de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008. (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Rarefação linfóide	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)		(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	90,3
Edema na medular	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)				(1/2)		(1/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)		48,4
Linfonodo reativo										(1/2)	(1/2)						6,50
Hipoplasia dos folículos linfóides											(1/2)						3,23
Sem alteração																	0
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 2 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas glândulas parótidas de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Degeneração vacuolar hidrópica do epitélio do ducto	(1/1)																3,23
Infiltrado mononuclear multifocal discreto						(1/2)											3,23
Infiltrado mononuclear focal moderado							(1/2)										3,23
Infiltrado mononuclear focal discreto										(1/2)							3,23
Calcificação														(2/2)			3,23
Sem alteração		(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)		(2/2)	(2/2)	80,6
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 3 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas glândulas mandibulares de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %	
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M		
Hiperplasia	(1/1)																	3,23
Infiltrado mononuclear focal discreto									(2/2)		(2/2)							12,9
Congestão													(1/2)					3,23
Sem alteração		(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)		(2/2)		(2/2)		(2/2)	(2/2)	(2/2)		80,6
Presença do Agente (PCR)																		-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

5.1.2.4 Pulmão

Foram avaliadas alterações nos pulmões direito e esquerdo. Predominantemente, ocorreu pneumonia intersticial difusa variando de discreta a moderada em 100 % dos animais (Figura 3.b) Também foi observado enfisema pulmonar (80,6 %) em todos os períodos pós-inoculação, além de congestão (61,3 %) que ocorreu aos 15, 30, 45, 75, 90, 105 dias, quatro, cinco, seis, oito, nove e dez meses pós-inoculação.

Outras alterações ocorreram em menor predominância como hiperplasia do tecido linfóide (12,9 %) associado aos bronquíolos e broncopneumonia purulenta, edema pulmonar e espessamento de pleura, todos com a mesma porcentagem (3,23 %). A presença de infiltrado mononuclear que variaram de discreto a intenso, com localização peribronquiolar e perivascular também foram descritos em períodos diversos e podem ser observados na tabela 4.

5.1.2.5 Baço

No baço ocorreu predominantemente hipoplasia de polpa branca (Figura 3.c), em 83,8 % dos animais estudados a partir dos 60 dias pós-inoculação até o final do experimento. Nos 15, 30, 45 dias foi evidenciada hiperplasia da polpa branca (reacional) (16,1 %). Também foi observada hipoplasia de polpa vermelha (19,3 %) aos cinco, seis, sete, oito e 11 meses pós-inoculação. As alterações estão descritas na tabela 5.

Tabela 4 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no pulmão direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Pneumonia intersticial difusa	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	100
Enfisema Pulmonar	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	80,6
Congestão	(1/1)	(2/2)	(2/2)		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)		(2/2)	(2/2)	(2/2)			61,3
Infiltrado mononuclear focal discreto	(1/1)																3,23
Infiltrado mononuclear multifocal discreto a moderado		(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)							29,0
Hiperplasia do tecido linfóide		(1/2)	(2/2)											(1/2)			12,9
Edema Pulmonar				(1/2)													3,23
Infiltrado mononuclear perivascular multifocal discreto						(1/2)											3,23
Infiltrado mononuclear subpleural multifocal discreto							(1/2)										3,23
Infiltrado mononuclear peribronquiolar multifocal discreto a moderado								(1/2)									3,23
Espessamento de pleura									(1/2)								3,23
Infiltrado mononuclear multifocal intenso														(1/2)	(1/2)		6,50
Broncopneumonia purulenta subaguda															(1/2)		3,23
Sem alteração																	0
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 5 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no baço de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Hiperplasia de Polpa branca	(1/1)	(2/2)	(2/2)														16,1
Hipoplasia de Polpa Branca				(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	83,8
Hipoplasia de Polpa Vermelha									(2/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)			(1/2)		19,3
Hiperplasia de Polpa Vermelha										(1/2)		(1/2)		(2/2)			12,9
Sem alteração																	0
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

5.1.2.6 Fígado

No fígado, em 80,6 % dos animais foi observada a hiperplasia das células de Kupffer, em quase todos os períodos pós-inoculação, exceto aos 12 meses. Degeneração gordurosa (38,7 %) foi observada dos 15 dias até os quatro meses pós-inoculação. Infiltrado mononuclear multifocal discreto (36,0 %), foi verificado aos 30, 75, 90, 105 dias, cinco, seis, sete, nove e 11 meses. Infiltrado mononuclear periportal multifocal discreto (29,0 %) (Figura 3.d) ocorreu aos 45 dias, cinco, seis, sete, nove e 11 meses. Também foram descritos congestão (19,3 %), infiltrado mononuclear focal discreto (12,9 %), necrose difusa (9,70 %), hiperplasia do tecido conjuntivo do espaço porta (6,50 %), e presença de macrófagos espumosos (3,23 %). Apenas 3,23 % dos fígados examinados não apresentaram alterações microscópicas. As alterações histopatológicas e os períodos em que foram observadas encontram-se na tabela 6.

5.1.2.7 Rim

Foram avaliadas as alterações nos rins direito e esquerdo. Houve glomerulonefrite proliferativa membranosa em 100 % dos rins examinados (Figuras 3.e). Esclerose glomerular (32,6 %) foi descrita nos últimos períodos aos oito, nove, dez, 11 e 12 meses. Presença de proteína na luz tubular (29,0 %) foi observada aos 30, 45 dias, oito, nove e dez meses pós-inoculação. Calcificação na medular (16,1 %) foi evidenciado aos 75 dias, nove e dez meses (Figura 3.f). Atrofia do tufo capilar glomerular ocorreu apenas aos quatro e cinco meses em 12,9% dos animais. Degeneração hidrópica do epitélio tubular (12,9 %) esteve presente nos primeiros períodos, aos 30 e 45 dias pós-inoculação. Hiperplasia das células do tufo capilar glomerular e presença de proteína no espaço de Bowman, congestão glomerular, infiltrado mononuclear focal discreto, também foram observadas e estão descritos na tabela 7.

Tabela 6 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas no fígado de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Hiperplasia das células de Kupffer	(1/1)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)		80,6
Degeneração gordurosa	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)									38,7
Congestão	(1/1)	(1/2)	(2/2)		(1/2)		(1/2)	(1/2)	(1/2)			(1/2)					19,3
Infiltrado mononuclear focal discreto	(1/1)	(1/2)	(1/2)					(1/2)									12,9
Necrose difusa	(1/1)	(1/2)	(1/2)														9,70
Infiltrado mononuclear multifocal discreto no parênquima		(1/2)			(1/2)	(1/2)	(1/2)		(1/2)	(2/2)	(1/2)		(2/2)		(1/2)		36,0
Hiperplasia do tecido conjuntivo do espaço porta		(1/2)														(1/2)	6,50
Presença de macrófagos espumosos		(1/2)															3,23
Infiltrados mononuclear periportal multifocal discreto			(1/2)						(2/2)	(2/2)	(1/2)		(2/2)		(1/2)		29,0
Sem alteração																(1/2)	3,23
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 7 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos rins direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Glomerulonefrite proliferativa membranosa	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	100
Proteína nos glomérulos/túbulos		(2/2)	(1/2)									(2/2)	(2/2)	(2/2)			29,0
Degeneração hidrópica do epitélio tubular		(2/2)	(2/2)														12,9
Hiperplasia das células do tufo capilar glomerular e presença de proteína no espaço de Bowman		(2/2)															6,50
Congestão medular				(2/2)	(2/2)												12,9
Congestão glomerular				(2/2)													6,50
Calcificação					(1/2)								(2/2)	(2/2)			16,1
Atrofia do tufo capilar glomerular								(2/2)	(2/2)								12,9
Infiltrado mononuclear focal discreto									(2/2)								6,50
Infiltrado mononuclear multifocal discreto										(1/2)							3,23
Esclerose glomerular												(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	32,6
Sem alteração																	0
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo.

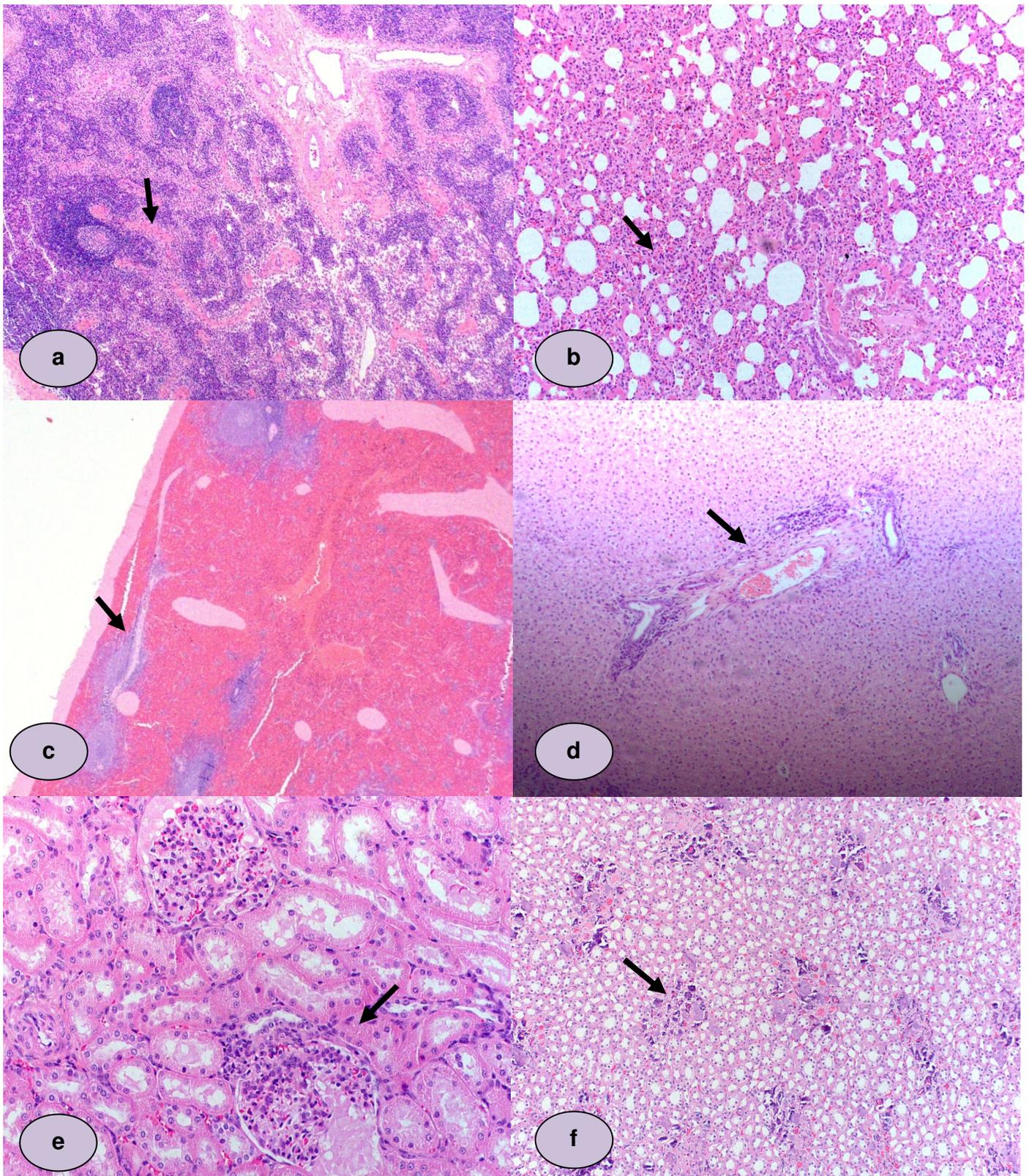


Figura 3

a. Linfonodo pré-escapular com edema na medular – 60 dias pós-inoculação - HE- 5 X

b. Pulmão, com pneumonia intersticial difusa – 30 dias pós-inoculação - HE - 10 X

c. Baço evidenciando hipoplasia de polpa branca, hiperplasia de polpa vermelha e congestão – 7 meses pós-inoculação - HE - 2.5 X

d. Fígado com infiltrado mononuclear multifocal discreto – 30 dias pós-inoculação - HE - 5 X

e. Rim, com glomerulonefrite proliferativa membranosa e presença de proteínas no espaço de Bowman e no interior dos túbulos – 30 dias pós-inoculação – HE – 20 X

f. Rim, apresentando focos calcificação na região medular – 9 meses pós-inoculação - HE - 5 X

5.1.2.8 Testículo

Nos testículos a lesão que foi observada em todos os animais foi degeneração do epitélio seminífero, com uma ocorrência em 100 % dos órgãos examinados (Figuras 4.a).

Redução do número de células da linhagem espermatogênica e ausência do número de células da linhagem espermatogênica foram detectados, respectivamente, em 64,5 % e 41,9 % dos testículos em períodos variados.

Fibrose intertubular foi encontrada em 19,3 % dos testículos aos oito, nove, dez e 11 meses (Figuras 4.b). Infiltrado mononuclear focal discreto e calcificação foram observados aos 45 e 60 dias, ambos com 6,50 %. Atrofia tubular e presença de gotas hialinas com 3,23 % de ocorrência em ambas. As alterações com os tempos são demonstradas na tabela 8.

5.1.2.9 Epidídimo

5.1.2.9.1 Cabeça

Alterações na cabeça do epidídimo se caracterizavam por hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e predomínio de tecido conjuntivo que variou de frouxo (90,3 %) a denso (25,8 %). Estas alterações foram encontradas em todos os períodos.

Aos 30, 90, 105 dias quatro, cinco, sete, oito, nove, 11 e 12 meses pós-inoculação verificou-se extravasamento de espermatozóides (45,2 %). Também foi visualizado infiltrado mononuclear focal discreto (9,70 %) aos 15, 30 dias e 12 meses (Figura 4.c). Outras alterações incluíram degeneração vacuolar das células epiteliais (9,70 %), infiltrado mononuclear multifocal discreto (9,70 %), infiltrado mononuclear perivascular focal discreto (3,23 %), necrose das células do ducto (3,23 %). Não foram observadas alterações em 12,9% das cabeças dos epidídimos examinados. As alterações e períodos estão descritas na tabela 9.

Tabela 8 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nos testículos direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %	
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M		
Degeneração do epitélio seminífero	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	100	
Ausência do número de células da linhagem espermatogênica	(1/1)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(1/2)							(2/2)	(2/2)	(1/2)			(2/2)	41,9
Redução do número de células da linhagem espermatogênica			(1/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)				(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	64,5
Infiltrado mononuclear focal discreto			(1/2)	(1/2)														6,50
Calcificação intratubular			(1/2)	(1/2)														6,50
Presença de gotas hialinas			(1/2)															3,23
Atrofia tubular				(1/2)														3,23
Fibrose intertubular													(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)		19,3
Sem Alteração																		0
Presença do Agente (PCR)																		-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 9 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas cabeças dos epidídimos direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Hipoplasia dos ductos epididimários com presença de tecido conjuntivo frouxo	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	90,3
Infiltrado mononuclear focal discreto	(1/1)	(1/2)														(1/2)	9,70
Extravasamento de espermatozóides		(1/2)				(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)		(1/2)	(2/2)	(1/2)		(1/2)	(2/2)	45,2
Degeneração vacuolar das células epiteliais			(1/2)		(1/2)				(1/2)								9,70
Infiltrado mononuclear multifocal discreto					(1/2)	(1/2)								(1/2)			9,70
Necrose das células do ducto					(1/2)												3,23
Hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e presença de tecido conjuntivo denso						(1/2)	(1/2)	(1/2)		(1/2)			(1/2)	(2/2)			25,8
Infiltrado mononuclear perivascular multifocal discreto							(1/2)							(1/2)			6,50
Sem alteração		(1/2)	(1/2)		(1/2)	(1/2)											12,9
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

5.1.2.9.2 Corpo

As alterações predominantes no corpo do epidídimo foram hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e predomínio de tecido conjuntivo que variou de frouxo (80,6 %) a denso (41,4 %), estas alterações ocorreram em todos os períodos.

Aos 75 e 90 dias, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove e 12 meses pós-inoculação, verificou-se o extravasamento de espermatozoides (29,0 %) (Figura 4.e). Também foi encontrado degeneração vacuolar das células epiteliais (12,4 %), infiltrado mononuclear multifocal discreto (3,23 %), infiltrado mononuclear focal discreto (1,61 %), necrose das células do ducto (3,23 %). Não apresentaram alterações 12,9 % das caudas dos epidídimos examinadas. As alterações e os períodos estão apresentados na tabela 10.

5.1.2.9.3 Cauda

As alterações predominantes na cauda foram hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e predomínio de tecido conjuntivo que variou de frouxo (83,8 %) a denso (16,1 %), em todos os períodos.

Aos 30, 75, 90, 105 dias, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, 11 e 12 meses pós-inoculação, foi visualizado extravasamento de espermatozoides (74,2 %) (Figuras 4.f). Também foram evidenciados infiltrado mononuclear multifocal discreto (9,70 %), focal discreto (3,23 %), atrofia ductal por compressão (3,23 %), edema perivascular (3,23 %). Não apresentaram alterações 3,23 % das caudas dos epidídimos examinadas. As alterações e os períodos podem ser observados na tabela 11.

Tabela 10 - Lesões histopatológicas observadas e porcentagem de ocorrência, nos corpos epididimários direito e esquerdo de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n ° de animais com lesão/ n ° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Hipoplasia dos ductos epididimários e presença de tecido conjuntivo frouxo	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	80,6
Degeneração vacuolar das células epiteliais	(1/1)		(2/2)		(1/2)												12,9
Infiltrado mononuclear focal discreto		(1/2)															3,23
Hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e presença de tecido conjuntivo denso					(1/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)		(1/2)		(1/2)		(2/2)			29,0
Extravasamento de espermatozóides					(1/2)	(2/2)		(1/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)			(1/2)	41,9
Necrose das células dos ductos					(1/2)												3,23
Infiltrado mononuclear multifocal discreto						(1/2)											3,23
Sem alteração	(1/1)	(1/2)		(1/2)	(1/2)												12,9
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 11 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas nas caudas epididimárias direita e esquerda de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Hipoplasia dos ductos epididimários e presença de tecido conjuntivo frouxo	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	83,8
Extravasamento de espermatozóides		(2/2)			(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	74,2
Atrofia ductal por compressão		(1/2)															3,23
Hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e presença de tecido conjuntivo denso					(1/2)		(1/2)			(1/2)			(1/2)	(1/2)			16,1
Infiltrado mononuclear multifocal discreto						(1/2)	(1/2)									(1/2)	9,70
Edema perivascular discreto							(1/2)										3,23
Infiltrado mononuclear focal discreto								(1/2)									3,23
Sem alteração		(1/2)		(1/2)													3,23
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

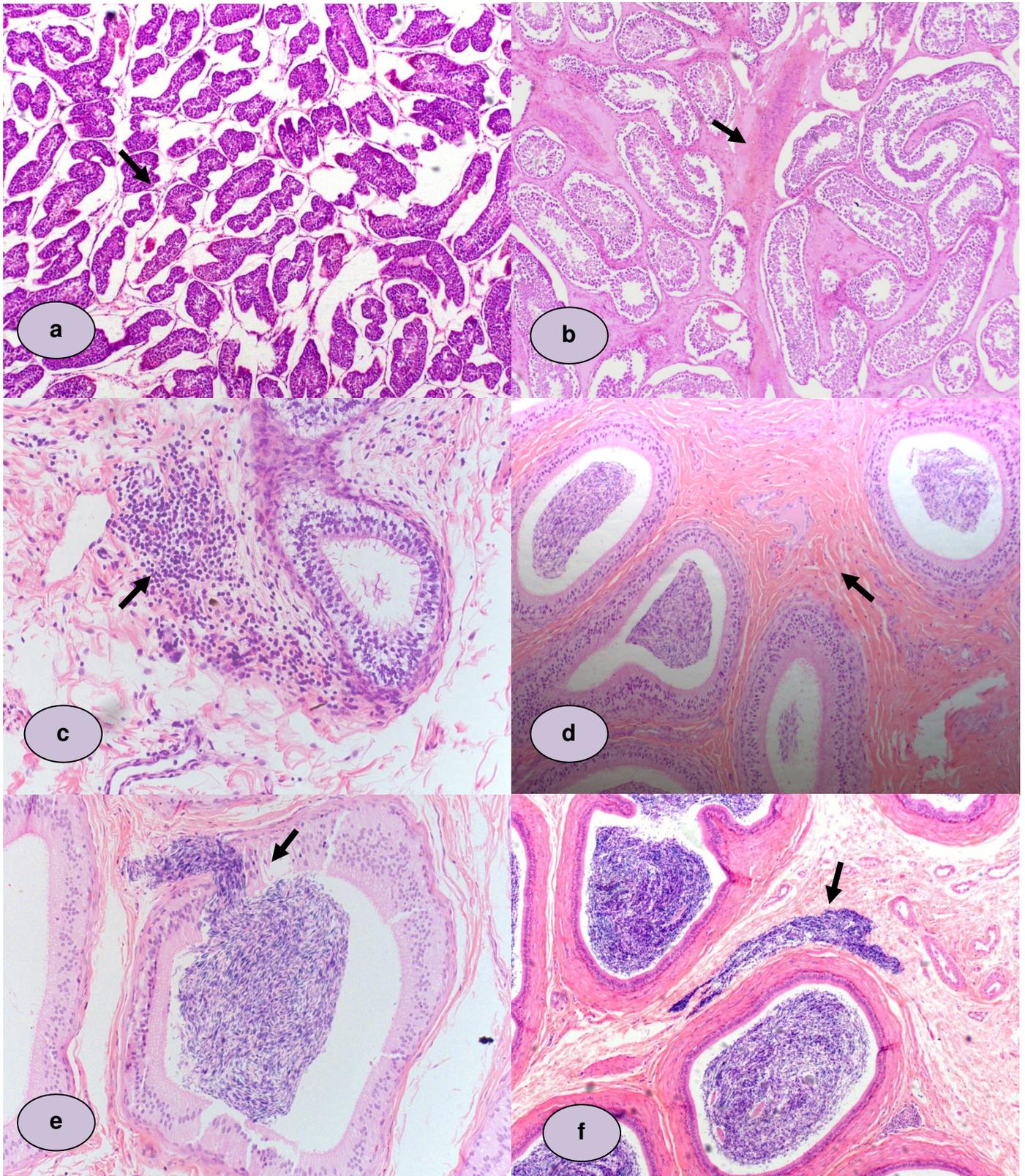


Figura 4

- a. Testículo, degeneração testicular e atrofia – 30 dias pós-inoculação - HE- 5 X
 b. Testículo, degeneração testicular e fibrose intersticial – 12 meses pós-inoculação – HE – 10 X
 c. Cabeça do epidídimo apresentando infiltrado mononuclear focal - 30 dias pós-inoculação – HE - 40 X
 d. Corpo do epidídimo apresentando hipoplasia dos ductos epididimários circundados com tecido fibroso denso – 45 dias pós-inoculação – HE - 10 X
 e. Corpo do epidídimo apresentando espermatozoides fora do ducto epididimário – 8 meses pós-inoculação – HE -10 X
 f. Cauda do epidídimo apresentando espermatozoides fora do ducto epididimário – 75 dias pós-inoculação – HE – 10 X

5.1.2.10 Bexiga

Infiltrado mononuclear multifocal discreto, ocorreu em 22,6 % das bexigas examinadas aos 45, 90, 105 dias, cinco, nove e dez meses pós-inoculação. A congestão (19,3 %) foi evidenciada aos 60, 90, 105 dias e 11 meses. Também foram visualizados infiltrado mononuclear focal discreto a moderado (6,5 %) aos 12 meses e metaplasia escamosa do epitélio (3,2 %) aos 45 dias. Das bexigas examinadas 54,8 % não apresentaram alterações dignas de nota. As alterações e os períodos são demonstrados na tabela 12.

5.1.2.11 Vesícula Seminal

As alterações nas vesículas seminais ocorreram até os 75 dias pós-inoculação. Aos 75 dias foi observado infiltrado mononuclear focal discreto, aos 30 e 60 dias congestão e hemorragia e aos 60 dias também foi observado edema ambos apresentando 6,5 % de ocorrência. Não apresentaram alterações 87,0 % dos órgãos examinados. As alterações e os períodos estão na tabela 13.

5.1.2.12 Glândula Bulbouretral

Na glândula bulbouretral, a lesão mais freqüente foi infiltrado mononuclear multifocal discreto (22,6 %) que ocorreu aos 45, 60 75, 90 dias, oito, nove meses pós-inoculação. Aos seis meses foi observado congestão (6,5 %) e aos 30 dias, infiltrado mononuclear focal discreto (3,2 %). Em 67,7 % destes órgãos examinados não foi observada alteração histopatológica. As alterações e os períodos estão na tabela 14.

Tabela 12 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na bexiga de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Infiltrado mononuclear multifocal discreto			(1/2)			(1/2)	(1/2)		(1/2)				(1/2)	(2/2)			22,6
Metaplasia escamosa do epitélio			(1/2)														3,23
Congestão				(2/2)		(1/2)	(2/2)								(1/2)		19,3
Infiltrado mononuclear focal discreto/moderado																(2/2)	6,50
Sem alteração	(1/1)	(2/2)			(2/2)	(1/2)		(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)		(1/2)		54,8
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 13 - Lesões histopatológicas observadas e porcentagem de ocorrência, na vesícula seminal de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Congestão		(1/2)		(1/2)													6,50
Hemorragia		(1/2)		(1/2)													6,50
Edema				(1/2)													3,23
Infiltrado mononuclear focal discreto					(2/2)												6,50
Sem alteração	(1/1)	(1/2)	(2/2)			(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	87,0
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 14 - Lesões histopatológicas observadas na glândula bulbouretral de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através do PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Infiltrado mononuclear focal discreto		(1/2)															3,2
Infiltrado mononuclear multifocal discreto			(1/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)						(1/2)	(1/2)				22,6
Congestão										(2/2)							6,5
Sem alteração	(1/1)	(1/2)	(1/2)		(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)		(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	67,7
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo / P=Positivo; N=Negativo

5.1.2.13 Ampola do ducto seminal

A alteração que ocorreu na ampola do ducto seminal foi infiltrado mononuclear multifocal discreto a moderado (12,9 %) aos 60 dias, sete e dez meses. Espessamento do estroma intertubular aos oito meses (3,2 %) e dilatação cística dos ductos (3,2 %) aos 60 dias. Não foram visualizadas alterações em 83,87 % das lâminas estudadas. As alterações com os períodos estão na tabela 15.

5.1.2.14 Próstata

Na próstata foram evidenciados infiltrado mononuclear focal moderado (22,6 %) aos quatro, cinco, seis e sete meses e infiltrado mononuclear multifocal discreto (3,2 %) aos 105 dias pós-inoculação. Em 74,2 % das lâminas não foram observadas alterações. As alterações com os períodos estão na tabela 16.

Tabela 15 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na ampola do ducto seminal de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através da PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Infiltrado mononuclear multifocal discreto a moderado				(1/2)							(1/2)			(2/2)			12,9
Dilatação cística dos ductos				(1/2)													3,2
Espessamento do estroma intertubular												(1/2)					3,2
Sem alteração	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)	(1/2)	(2/2)		(2/2)	(2/2)	83,8
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

Tabela 16 - Lesões histopatológicas e porcentagem de ocorrência, observadas na próstata de carneiros infectados experimentalmente com *B. ovis* REO 198, durante os períodos pós-inoculação e presença do agente através do PCR. Botucatu, 2008 (n° de animais com lesão/ n° de animais avaliados no momento).

Alterações/ Período	Períodos Colheitas																Ocorrência %
	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105d	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12M	
Infiltrado mononuclear multifocal discreto							(1/2)										3,23
Infiltrado mononuclear focal moderado								(2/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)						22,6
Sem alteração	(1/1)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(1/2)			(1/2)		(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	74,2
Presença do Agente (PCR)																	-

Células preenchidas indicam a presença de lesões e PCR Positivo

5.2 Principais achados histopatológicos dos órgãos avaliados nos vários momentos

Nos linfonodos, as alterações encontradas com mais frequência foram rarefação linfóide e edema na região medular.

Nas glândulas parótidas e mandibulares, foi predominante infiltrado mononuclear multifocal discretos a moderados.

Nos pulmões, todos os animais apresentaram pneumonia intersticial difusa variando de discreta a moderada, com a presença de congestão e enfisema pulmonar. Alguns animais também apresentaram infiltrado mononuclear peribronquiolar multifocal, variando de discreto a moderado.

No baço, as lesões mais observadas foram hipoplasia de polpa branca e hipoplasia dos folículos linfóides.

No fígado, o que foi evidenciado com maior frequência foi hiperplasia das células de Kupffer e infiltrado mononuclear periportal discreto a moderado.

Nos rins, todos os animais apresentaram glomerulonefrite proliferativa membranosa.

Nos testículos, a lesão que ocorreu em todos os animais foi degeneração do epitélio seminífero variando de discreta à moderada, com ausência ou diminuição do número de células da linhagem espermatogênica. Em alguns animais também houve a presença de infiltrado mononuclear intersticial focal discreto.

Nos epidídimos (cabeça, corpo e cauda) as lesões observadas foram semelhantes, sendo a hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e predomínio de tecido conjuntivo variando de frouxo a denso o achado mais comum. Também foi evidenciada extravasamento de espermatozoides em muitos animais, sendo que esta lesão ocorreu com mais frequência na cauda do epidídimo. Além destas alterações descritas, alguns tecidos apresentaram também infiltrado mononuclear focais/multifocais que variaram de discreto a moderado.

Nas vesículas seminais, as lesões mais freqüentes foram congestão e hemorragia.

Na glândula bulbouretral, na ampola, na bexiga e na próstata os achados mais comuns foram infiltrado mononuclear focal/multifocal discretos a moderados.

5.3 Lesões anatomopatológicas - Presença do agente através da técnica de PCR

Nos linfonodos, a *B. ovis* foi detectada mais freqüentemente no linfonodo inguinal, aos 15, 30, 45, 90, 105 dias, quatro, seis e 11 meses. Nos linfonodos parotídeos a presença do agente ocorreu aos 45 dias e cinco meses. No linfonodo pré-escapular, *B. ovis* foi observada aos 90 dias, no linfonodo mediastinal aos 60 dias e nove meses e no linfonodo mesentérico aos 11 meses. Todos os linfonodos em que se detectou DNA bacteriano apresentaram edema na medular e rarefação linfóide.

No pool das glândulas mandibulares e parótidas, a presença do agente ocorreu aos 45, 75, 90 dias e 10 meses. Aos 90 dias a glândula parótida apresentou infiltrado mononuclear multifocal discreto e aos 10 meses e neste período a outra lesão observada foi calcificação. A glândula mandibular não apresentou alterações histopatológicas e nenhuma das glândulas apresentou alteração macroscópica.

No baço, *B. ovis* foi detectada aos quatro meses pós-inoculação, momento em que o mesmo apresentou-se congesto e microscopicamente com hipoplasia de polpa branca. Aos seis meses quando também foi detectada a presença do DNA bacteriano, microscopicamente o órgão apresentou hipoplasia de polpa branca, seguido de hiperplasia ou hipoplasia de polpa vermelha. .

No fígado, a presença do agente foi ocorreu aos seis e sete meses pós-inoculação, sem alterações macroscópicas, porém microscopicamente visualizaram-se infiltrado mononuclear periportal multifocal discreto, além hiperplasia das células de Kupffer em ambos os períodos. Esses

achados também foram observados em períodos onde não houve a presença de *B. ovis* na PCR.

No pulmão a presença do DNA foi detectado aos 90 dias pós-inoculação sem alterações macroscópicas e microscopicamente foi observada pneumonia intersticial difusa, congestão, enfisema e infiltrado mononuclear perivascular discreto e aos 10 meses o agente também foi encontrado, apresentando macroscopicamente edema pulmonar, hemorragias petequiais e sufusões com áreas de necrose e microscopicamente pneumonia intersticial difusa.

Nos rins, o DNA bacteriano foi detectado aos 60 dias, sete, oito e 11 meses pós-inoculação. Aos 60 dias a lesão microscópica observada foi glomerulonefrite proliferativa membranosa, congestão na medular, espessamento da membrana e congestão discreta. Aos sete meses a lesão foi semelhante, porém com evidencição de oclusão da luz capilar no glomérulo. Aos oito meses, além da lesão anterior também se observou à proteína na luz dos túbulos e aos onze meses destruição do glomérulo. Nenhum dos rins apresentou lesões macroscópicas.

Na bexiga, o DNA bacteriano foi detectado aos 15, 30 e 90 dias, cinco, seis, oito, nove, dez, 11 e 12 meses. Aos 15 e 30 dias, seis e oito meses não foram descritas alterações. Aos 90 dias microscopicamente foi observado congestão, com infiltrado mononuclear perivascular multifocal discreto, sendo este também evidente aos cinco, nove, dez e onze meses, aos 11 meses apresentou congestão.

No testículo direito, a *B. ovis* foi encontrada aos 45, 90 dias, cinco, dez, 11,12 meses. Em todos os momentos a alteração microscópica que ocorreu foi degeneração do epitélio seminífero acompanhado macroscopicamente de aumento de tamanho aos cinco meses e fibrose intertubular aos dez, 11 e 12 meses.

No testículo esquerdo, a presença do agente foi observada aos 45, 60 dias, seis e dez meses, associadas com degeneração do epitélio

seminífero com presença de gotas hialinas. Visualizou-se infiltrado mononuclear focal discreto aos 45 e 60 dias e atrofia tubular aos 60 dias.

No epidídimo direito o DNA bacteriano foi evidenciado aos 45, 60 dias, sete e 11 meses, correlacionando com hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e presença de tecido conjuntivo que variou de frouxo a denso na cabeça, no corpo e na cauda. Aos 45 dias também ocorreu degeneração hidrópica do epitélio ductal no corpo do epidídimo e aos 11 meses o extravasamento de espermatozóides.

No epidídimo esquerdo a presença do agente ocorreu aos 10 e 11 meses pós-inoculação. De forma similar ao epidídimo direito, estando associado à hipoplasia dos ductos epididimários com fibrose intersticial e presença de tecido conjuntivo que variou de frouxo a denso na cabeça, no corpo e na cauda.

Na vesícula seminal, *B. ovis* foi evidenciada aos 45, 90 dias, cinco, seis, nove, dez e 11 meses pós-inoculação, porém sem alterações macroscópicas e microscópicas nesses momentos.

Na glândula bulbouretral, *B. ovis* foi demonstrada aos 90, 105 dias, sete, oito, nove e dez meses. Aos 90 dias, oito e nove meses a presença da bactéria estava associada a um infiltrado mononuclear perivascular multifocal discreto, sem alterações macroscópicas. Alterações histopatológicas não foram observadas nos demais momentos.

Na ampola do ducto a *Brucella ovis* foi encontrada aos 60, 75 dias, 10 e 11 meses pós-inoculação. Aos 60 dias e 10 meses foi observada hiperplasia de epitélio com infiltrado mononuclear multifocal discreto. Nos demais tempos não houve alterações histopatológicas e/ou macroscópicas.

Na próstata, o agente foi encontrado aos 45, 60, 75 dias e oito, dez e 11 meses pós-inoculação, sem alterações macroscópicas e microscópicas detectáveis.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 PCR

Brucella ovis foi detectada inicialmente no linfonodo inguinal e bexiga aos 15 e 30 dias pós-inoculação. A detecção da bactéria neste período está provavelmente relacionada com a via de inoculação prepucial, uma vez que de acordo com Fensterbank et al. (1982), Blasco et al. (1987) e Marín, (1989), no início da infecção, o agente permanece confinado nos linfonodos próximos aos locais de entrada por duas ou três semanas e em seguida ocorre a bacteremia passando para os linfonodos distantes, os órgãos sexuais e as glândulas acessórias, aspecto também observado nesse estudo, com a disseminação do agente para outros linfonodos e órgãos.

Ainda neste período inicial e de forma semelhante à presença de *B. ovis* na bexiga pode ser justificada pela via de infecção prepucial sendo responsável pela presença do agente na urina, como pôde ser observado pelo cultivo positivo nas primeiras semanas pós-inoculação, segundo experimento realizado por Nozaki (2008), com estes mesmos animais.

Após este período inicial (15/30 dias), o agente pôde ser observado em outros linfonodos e órgãos. Segundo Harmon et al. (1988) e Enright (1990) *Brucella* spp. invasoras que não sofreram defesa das barreiras físicas como nas submucosas, são distribuídas para os linfonodos regionais pela drenagem linfática e conseqüentemente, para outros órgãos.

A partir dos 45 dias observou-se a presença do agente no linfonodo parotídeo, o que poderia ser justificado pela outra via de inoculação utilizada que foi a conjuntival uma vez que este linfonodo é responsável pela drenagem linfática dos olhos.

Davis et al. (1990) relata a presença da *B. abortus* no linfonodo parotídeo nas duas, três, quatro, cinco e seis semanas pós-inoculação. Em estudo com 11 vacas, inoculadas com *B. abortus* por via conjuntival, abatidas em intervalos semanais e colhidos fragmentos de linfonodos, a bactéria foi isolada dos linfonodos parotídeos e em uma quantidade maior nos linfonodos submandibulares, responsáveis pela drenagem do local da inoculação. De

acordo com os autores, o baixo número inicial de *Brucella* spp. infectando os linfonodos que drenam a cavidade oral sugere que poucas delas têm acesso à mucosa nasal e posteriormente a mucosa oral pelo ducto lacrimal (NILSEN e DUNCAN, 1990). Sendo assim, a não detecção do agente nos períodos anteriores a 45 dias poderia ser justificada pela baixa concentração bacteriana local ou pode também ter ocorrido reinfecção a partir do ambiente pelas bactérias eliminadas por meio de sêmen e urina dos animais infectados, uma vez que segundo Nozaki (2008) foi observada a presença do agente nestas excreções a partir de sete dias pós infecção.

Ainda aos 45 dias pós-inoculação foi detectada a presença do agente nas glândulas parótidas e mandibulares, aspecto que também poderia ser justificado pela infecção por via oral nesses animais a partir da ingestão de bactérias do meio ambiente. Rajashekara et al. (2005), em estudo com *B. melitensis*, observaram a presença da bactéria nas glândulas salivares, sugerindo por meio deste estudo, que a via oral é de grande importância, pois é por onde ocorre uma grande parte das infecções brucélicas. Nilsen e Duncan (1990), também enfatizaram a importância da infecção por via oral em bovinos infectados com *B. abortus*. Neste período, o agente manteve-se presente também no linfonodo inguinal, assim como nos 15 e 30 dias pós-inoculação.

Nesse mesmo período a bactéria foi detectada no testículo, no epidídimo e na próstata. De acordo com Fensterbank et al. (1982), Blasco et al. (1987) e Marín (1989), existe uma predileção do agente pelos órgãos reprodutores, sendo uma característica da doença nos machos. Essa predileção justifica a ocorrência de lesões, em pelo menos um, dos órgãos reprodutores, no decorrer dos períodos pós-inoculação até o final do experimento.

Aos 60 dias observou-se *B. ovis* no linfonodo mediastinal, nos rins, no testículo, no epidídimo, na ampola e na próstata. A presença de *Brucella* spp. nos linfonodos mediastinais sugere a disseminação da bactéria através da via respiratória. A infecção por essa via pode ter ocorrido a partir de bactérias eliminadas pela urina de animais infectados, evidenciada em trabalho paralelo realizado por Nozaki (2008). Por outro lado, a disseminação via

linfática, é também possível, pois a tendência é que a infecção se dissemine posteriormente para os linfonodos que não estão próximos a via de entrada. Segundo Davis et al. (1990) em estudo com *B. abortus*, a bactéria foi observada no linfonodo mediastinal, nas quatro e cinco semanas pós-inoculação, achados semelhantes a esse estudo. Ainda aos 60 dias pós-inoculação, foi detectada a bactéria nos rins. Nos períodos anteriores a eutanásia, os ovinos inoculados, excretaram *B. ovis* pela urina (NOZAKI, 2008), o que pode justificar a presença do agente nesse órgão. Outra justificativa seria pela infecção via ascendente, pois a bactéria pode ascender pelo ureter até os rins (CARLTON e MCGAVIN, 1998), e isto pode ter ocorrido, já que a inoculação foi via prepucial.

Nos 60 dias pós-inoculação, *B. ovis* esteve presente no testículo, no epidídimo, na ampola e na próstata, mostrando a predileção e persistência do agente pelos órgãos reprodutores.

Aos 75 dias o agente foi detectado na glândula mandibular/parótida, sugerindo mais uma vez, infecção via oral a partir do meio ambiente, visto que nesse momento existiam vários animais excretando a bactéria pela urina como foi observado no PCR e no cultivo bacteriológico por Nozaki (2008). A presença da bactéria também ocorreu no testículo, na ampola e na próstata, mantendo-se presente nos órgãos reprodutores.

Aos 90 dias o agente foi detectado no linfonodo pré-escapular, no linfonodo inguinal, na glândula mandibular/parótida, no pulmão, na bexiga, no testículo, na vesícula seminal e na glândula bulbouretral. Davis et al. (1990), relataram *B. abortus* nos linfonodos pré-escapulares de bovinos a partir da terceira semana pós-inoculação até a sexta semana. Nesse estudo, a presença do agente no linfonodo pré-escapular só ocorreu aos 90 dias pós-inoculação.

A presença do agente na bexiga sugere o curso da bactéria também pela via urinária, pois aos 60 dias pós-inoculação, foi observada a presença do agente nos rins, apesar da ausência da *B. ovis* na PCR ou no cultivo de urina (NOZAKI, 2008). Fensterbank et al. (1982), Blasco et al. (1987) e Marín (1989), relataram que bactéria foi isolada em trabalhos com cultivo

bacteriano de rins. Biberstein et al. (1964), em seu estudo, constataram que após dois meses de inoculação houve a presença da bactéria nos rins semelhantes aos achados deste experimento.

Ainda aos 90 dias pós-inoculação observou-se o agente nos pulmões. A localização da bactéria no linfonodo mediastinal aos 60 dias e a sua disseminação pela via linfática, pode ser a justificativa pela ocorrência da *B. ovis* nesse período. A presença da bactéria no pulmão só foi relatada por Biberstein et al. (1964), pelo isolamento bacteriano.

Aos 105 dias o agente manteve-se na glândula bulbouretral e no linfonodo inguinal, assim como estiveram presentes no período anterior.

Aos quatro meses pós-inoculação, a bactéria foi detectada no linfonodo inguinal, porém também foi observada pela primeira vez, a presença do agente no baço. Biberstein et al. (1964), observaram a presença da bactéria no baço em períodos superiores a dois meses pós-inoculação os achados observados no estudo anterior são semelhantes ao nosso estudo. Porém Davis et al. (1990) verificaram a presença do agente no baço de bovinos inoculados com *B. abortus*, a partir da quarta semana pós-exposição, até a sexta semana.

Aos cinco meses pós-inoculação a bactéria foi observada novamente no linfonodo parotídeo, assim como nos 45 dias, mais uma vez na bexiga, além dos testículos e da vesícula seminal. A presença da *B. ovis* na bexiga caracteriza a importância desses órgãos no contexto epidemiológico, quanto às vias de eliminação da *B. ovis* (PAOLICHI, 2001), confirmado pelo trabalho de Nozaki (2008).

No sexto mês, o agente foi observado mais uma vez no linfonodo inguinal, sendo este o que mais se apresentou positivo durante o experimento, entretanto essa positividade ocorreu em intervalos curtos. Nesse período, o agente esteve presente no baço, assim como aos quatro meses e foi observado pela primeira vez no fígado no período seguinte. Segundo Biberstein et al. (1964), em seu experimento, após dois meses de inoculação a bactéria foi isolada do fígado desses animais. Davis et al. (1990), relataram a presença do agente no fígado apenas na sexta semana pós-inoculação.

Aos sete meses o agente esteve presente no fígado, sugerindo bacteremia e também nos rins. A presença do agente no fígado sugere o desenvolvimento das bactérias a partir daí. Havendo nesse período isolamento bacteriano da urina destes animais descrito por Nozaki (2008). Ainda aos sete meses, também foi observada PCR positiva nos órgãos sexuais e glândulas acessórias.

Aos oito meses o agente manteve-se presente nos rins e na bexiga. Neste período foi descrito por Nozaki (2008), presença de *B. ovis* na urina através do isolamento. Também foi descrito positividade na glândula bulbouretral, permanecendo a bactéria nos órgãos do sistema reprodutor.

Aos nove meses observou-se mais uma vez a presença de *B. ovis* no linfonodo mediastinal, na bexiga e nos órgãos reprodutores. A partir dos dez meses as glândulas mandibulares/parótidas apresentaram positividade. Aos 11 meses o linfonodo mesentérico apresentou-se positivo pela primeira vez. No trabalho desenvolvido por Davis et al. (1990) só foi observada a presença do agente nesse linfonodo no final de experimento, na sexta semana. Aos dez, onze e doze meses, a bexiga apresentou positividade, não havendo urina positiva pela PCR, porém o isolamento bacteriano positivo da urina (NOZAKI, 2008). Os demais órgãos reprodutores e as glândulas acessórias apresentaram-se positivos na PCR, característica que indica novamente a predileção do agente pelos órgãos sexuais (BIBERSTEIN et al., 1964).

O linfonodo faríngeo foi o único dos linfonodos em que não se detectou o agente neste experimento, discordando dos achados observados por Davis et al. (1990), com *B. abortus*, em que se relatou através de isolamento bacteriano, positividade aos três, quatro, cinco e seis semanas pós-exposição.

Com relação aos achados encontrados neste trabalho, é possível comparar com o único trabalho encontrado na literatura sobre a patogenia de *B. ovis* realizado por Biberstein et al. (1964), afirmando que a infecção pela cepa REO, leva a uma bacteremia avançada em um ritmo extremamente lento, com predileção pelos órgãos reprodutores.

Sendo assim, este estudo sugere que o agente pode ser encontrado em todos os órgãos do animal e também que a passagem por órgãos que não os do sistema imunológico ou genital é transitória, porém neste estudo a presença da bactéria pôde ser observada principalmente no linfonodo inguinal, na bexiga, no epidídimo, nos testículos, na glândula bulbouretral, na vesícula seminal, na ampola e na próstata.

6.2 Achados Anatomopatológicos

6.2.1 Alterações Macroscópicas

Macroscopicamente as alterações observadas tiveram uma maior ocorrência nos órgãos do aparelho reprodutor.

A alteração mais freqüente foi hiperplasia dos linfonodos, segundo Biberstein et al. (1964) o aumento dos linfonodos e do baço pode estar relacionado à resposta imunológica. No baço observou-se congestão, o que pode ser justificado pelo processo de eutanásia com barbitúricos (CARLTON e MCGAVIN, 1988).

Com relação ao aparelho reprodutor, os testículos de 3,5 % dos animais apresentaram atrofia e 3,5 % ao corte apresentaram áreas de calcificação. Segundo Badiola et al. (1982) a atrofia testicular é uma característica comum na fase crônica da doença. Neste mesmo estudo, Badiola et al. (1982) ainda descreveram macroscopicamente a formação de granulomas e calcificação na superfície de corte. As alterações observadas por esses autores assemelham-se com as deste estudo com relação à presença de calcificações, porém não foi observada a presença de granulomas durante o decorrer deste experimento. Garcia-Carrillo et al. (1974) descreveram a atrofia do epitélio seminal ocorrendo mais freqüentemente que as lesões epididimárias e sugere que a atrofia testicular não deveria ser secundária a epididimite já que a mesma pode ocorrer de forma independente.

Nesse estudo, três animais apresentaram alterações macroscópicas no epidídimo. A cabeça do epidídimo de um dos animais apresentou-se consistente ao corte, com grânulos e com abscesso com líquido

mucopurulento e em outro animal hemorragia no corpo do epidídimo. Nas caudas dos epidídimos, pode-se observar o aumento de tamanho em um dos animais. Os achados deste estudo concordam com Jebson et al. (1955), que relataram epidídimos firmes e aumentados de volume, sendo a cauda do epidídimo a mais afetada. Jansen (1980) observou algumas lesões como aumento da cabeça e cauda dos epidídimos e em alguns animais parede espessa, que após o corte apresentava material purulento acinzentado com sangue e ainda outros animais apresentaram comprometimento na cauda do epidídimo com um aumento da resistência ao corte, achados semelhantes aos deste experimento.

Na vesícula seminal, não foram observadas alterações macroscópicas, contrariamente a Jansen (1980), que observou em um animal, aumento do tamanho e aspecto lobular, e Foster et al. (1987), que descreveram as vesículas seminais com aumento de volume com ductos preenchidos por líquidos, e Blasco (1990), que relatou o aumento de tamanho das vesículas seminais, com tubos dilatados ou presença de fluidos observados na superfície cortada.

Na glândula bulbouretral, na próstata e na ampola não foram observadas alterações macroscópicas, semelhante aos achados observados com Blasco (1990) que não verificou alterações nestes órgãos.

6.2.2 Alterações Histopatológicas

Com relação às alterações histopatológicas dos linfonodos, foi observada com mais freqüência a rarefação do tecido linfóide e o edema na região medular. Achados discordantes aos relatados por Biberstein et al. (1964).

Nas glândulas mandibulares foi observados infiltrado mononuclear focal/multifocal, discreto a moderado em pequena quantidade e em tempos variados pós-inoculação. Nos períodos onde foram observadas essas alterações, não se detectou a presença do agente pela PCR. Nas glândulas parótidas observou-se infiltrado mononuclear focal discreto também

não relacionado à presença do agente através da PCR. De acordo com Jones et al. (2002) as glândulas salivares podem ser afetadas por processos infecciosos que se originam em suas vizinhanças, o que poderia justificar o processo inflamatório nesses órgãos. Não foram encontrados trabalhos na literatura científica relacionados às lesões histopatológicas nas glândulas parótidas e mandibulares.

As alterações histopatológicas observadas com maior frequência nos pulmões foram pneumonia intersticial difusa, congestão e edema pulmonar. Nos trabalhos com infecção pela *B. ovis*, apenas Searson (1987), ao estudar ovinos que foram infectados de forma natural, observou pneumonia em 72 % dos animais positivos através do isolamento. No entanto afirma que essa afecção não teve relação significativa entre a presença da bactéria e a lesão observada. Segundo Carlton e MacGavin (1998) e Jones et al. (2000), as causas de pneumonia intersticial podem ser várias, porém nenhuma delas está relacionada com esse patógeno.

Inicialmente, no baço, foi visualizada hiperplasia de polpa branca dos 15 aos 45 dias pós-inoculação. Segundo Tizard (2002), a hiperplasia de polpa branca demonstra ativação celular com aumento de linfócitos e macrófagos. Mense et al. (2001) estudando camundongos expostos a *B. melitensis* e submetidos a eutanásia na sexta e oitava semanas pós-inoculação, observaram hiperplasia de polpa branca e hiperplasia de polpa vermelha, achados semelhantes aos deste estudo.

A partir dos 60 dias até o final do experimento foi observado hipoplasia de polpa branca, que foi o achado mais comum no baço. O baço constitui um importante órgão de defesa em virtude da quantidade de células fagocitárias. A polpa branca é rica em linfócitos e é o local onde ocorrem as respostas imunes. A hipoplasia da polpa branca sugere uma diminuição na resposta imune (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; TIZARD, 2002), o que pode justificar a persistência da doença durante o período do experimento. Biberstein et al. (1964), relatam ligeira hiperplasia de baço, porém ressaltam que essa poderia passar despercebidas, senão observadas minuciosamente. Stevens et al. (1994), estudaram a resposta imune e patológica de diversas cepas de *B.*

abortus no baço de camundongos e observaram aos 60 dias pós-inoculação hipoplasia de polpa branca com diminuição dos centros germinativos e ativação celular (macrófagos). Mense et al. (2004) observaram em oito macacos inoculados com *B. melitensis* e submetidos a eutanásia 64 dias após a inoculação hipoplasia de polpa branca.

Com relação às alterações histopatológicas no fígado dos animais deste experimento, observou-se com maior frequência hiperplasia das células de Kupffer, seguido de degeneração gordurosa e presença de infiltrados periportais focais/multifocais, discretos a moderados. Os achados deste estudo discordam com os de Biberstein et al. (1964), que relataram a ausência da resposta a infecção nos órgãos parenquimatosos, como no fígado e nos rins. No entanto, esses achados podem se justificar pela função das células de Kupffer, que exercem uma função fagocitária no fígado sendo responsáveis por digerir e destruir material estranho, como microorganismos, pelo processo de fagocitose (BANKS, 1992). Sugere-se que o aumento da quantidade destas células no fígado destes animais seja uma resposta a infecção.

Cuba-Caparó e Myers (1973), em seu estudo utilizando ratos de laboratório utilizando *B. melitensis* observaram no fígado destes animais a presença de granulomas. Em nosso experimento apesar da presença de células inflamatórias em vários tempos pós-inoculação, não foi observada a presença de granulomas hepáticos, o que eventualmente pode ser justificado pela amostra utilizada.

A glomerulonefrite proliferativa membranosa foi uma lesão que ocorreu nos rins de todos os animais e em todos os períodos pós-inoculação. Segundo Carlton e MacGavin (1998) e Jones et al. (2000), as glomerulonefrites são imunologicamente mediadas. Resultam na maioria das vezes de mecanismos imunomediados, principalmente os que envolvem anticorpos contra membranas basais dos glomérulos ou a deposição de complexos imune solúveis. Organismos infecciosos geralmente estão associados a auto-imunidade e a glomerulonefrite por complexo imune em seres humanos e em outras espécies. Não foram encontrados na literatura, trabalhos que relatassem

a glomerulonefrite em animais com brucelose, mas esta lesão se justifica, provavelmente pela antigenicidade prolongada da infecção. Ustun et al. (2005), relataram a presença de glomerulonefrite proliferativa e de nefrite difusa, durante o curso da infecção por *Brucella* spp., em um paciente com 17 anos de idade.

A hiperplasia das células glomerulares com aumento do padrão lobular, sinéquias e oclusão da luz capilar do glomérulo, são achados que assemelham-se aos de Cuba-Caparó e Myers (1973) que observaram hipertrofia e hiperplasia do epitélio da cápsula de Bowman nos ratos, em todos os períodos do seu estudo, do primeiro ao quinto mês pós-inoculação.

Em nosso experimento foi observado adicionalmente a presença de proteína no espaço glomerular e nos túbulos no período inicial e no final da infecção. Cuba-Caparó e Myers (1973), também observaram a presença de proteína no espaço de Bowman. Além destas alterações descritas, observou-se infiltrado mononuclear focal/multifocal discreto aos cinco e seis meses pós-inoculação. Estes mesmos autores descreveram a presença de infiltrado inflamatório em graus variados, também em todos os períodos pós-inoculação, caracterizados por nefrite intersticial (CARLTON e MCGAVIN, 1988).

A principal alteração na bexiga foi infiltrado mononuclear focal/multifocal discreto a moderado. Não foi encontrado nenhum trabalho relatando as alterações na bexiga de animais de humanos relacionados a infecção por *Brucella* spp.

Com relação às alterações dos testículos, todos os animais apresentaram degeneração testicular. Birberstein et al. (1964) observaram degeneração testicular em seu experimento e a consideraram como sendo de causa inespecífica. Porém, em um estudo realizado com algumas espécies de ratos de laboratório, Cuba-Caparó e Myers (1973) observaram degeneração de caráter predominante e em intensidades variáveis, correlacionada com a *B. ovis*.

A degeneração testicular é uma lesão relativamente comum, que possui várias causas e muitas vezes desconhecidas, podendo ser uni ou bilateral, dependendo se a causa for local ou sistêmica. A hipoplasia e a degeneração testicular normalmente ocorrem juntas e a obstrução do fluxo de espermatozóides pode ser uma das causas. As células epiteliais são destruídas eventualmente, através de produtos bacterianos ou pela inflamação subjacente. A obstrução leva a uma pressão retrógrada, a ruptura dos túbulos seminíferos e extravasamento de espermatozóides para fora do ducto epididimário (ENRIGHT, 1990; CARLTON e MCGAVIN, 1998). Em nosso experimento todos os animais desenvolveram degeneração, sugerindo uma lesão decorrente da infecção.

Todos os animais apresentaram oligospermia ou azoospermia. Segundo Jebson et al. (1955) e Searson (1987), a redução da espermatogênese foi um achado comum em seus estudos, concordando com as alterações observadas neste experimento.

Ainda nos testículos, foi observado infiltrado mononuclear focal discreto aos 45 dias e 60 dias pós-inoculação. Segundo Biberstein et al. (1964), a presença de infiltrado inflamatório no interstício não foi freqüente, assim como no presente estudo. Estes achados discordam de Jebson et al. (1955), que relataram que a reação inflamatória seria a característica mais comum existente nos tecidos envolvidos. Jansen (1980) descreveu a presença de infiltrados inflamatórios na orquite aguda sugerido serem estes, o processo estabelecido neste experimento.

A presença de fibrose intertubular ocorreu no final do experimento, aos oito, nove, dez e onze meses pós-inoculação, o que indica o uma lesão crônica e de forma homogênea. Estes achados concordam com Jebson et al. (1955), que descreveram hiperplasia do epitélio tubular com fibrose; Biberstein et al. (1964), que observaram a presença de fibrose difusa ainda com obstrução de alguns túbulos e Jansen (1980) que também descreveu fibrose do tecido intertubular.

As lesões histopatológicas observadas na cauda do epidídimo ocorreram com mais freqüência do que na cabeça e no corpo do epidídimo. Concordando com vários autores que relatam que as lesões são observadas com mais freqüência na cauda do epidídimo (BIBERSTEIN, et al. 1964; SEARSON, 1987; FOSTER et al., 1989; WEST et al., 1993).

O achado mais comum na cabeça, no corpo e na cauda do epidídimo foi a hipoplasia dos ductos epididimários, com ausência de alterações inflamatórias nos vários períodos pós-inoculação.

Neste estudo foram observadas alterações sem a presença de reações inflamatórias em vários períodos pós-inoculação, além de fibrose intersticial, mostrando o tecido conjuntivo, arranjo de frouxo ou denso. Os achados deste estudo concordam com Jebson et al. (1955) e Cuba-Caparó e Myers (1973), onde os ductos epididimários estiveram normalmente aumentados de tamanho com hiperplasia epitelial e com ausência de reação inflamatória. Os achados deste experimento concordam com Jebson et al. (1955) e Plant et al. (1986), que também observaram a presença de fibrose intersticial.

O extravasamento de espermatozóides sem reação inflamatória e sem formação de granuloma espermático foi um achado comum neste trabalho. Este achado é discordante dos observados por outros autores. Paolicchi et al. (2001), descreveram lesões iniciais do epidídimo com progressão para fibrose intersticial, degeneração do epitélio epididimário com extravasamento de espermatozóides para o interstício, reação inflamatória e formação de granuloma espermático. Jebson et al. (1955), Birberstein et al. (1964), Cuba-Caparó e Myers (1973), Jansen (1980), Searson (1987), Foster et al. (1987), relatam granuloma espermático como um achado em seus trabalhos.

A epididimite ocorreu com mais freqüência nos primeiros períodos pós-inoculação na cabeça e na cauda do epidídimo. Alguns autores relatam epididimite na presença da *B. ovis*. Birberstein et al. (1964), Cuba-Caparó e Myers (1973), Jansen (1980), Searson (1987) relataram a presença

de células inflamatórias na observação histopatológica dos epidídimos, em períodos variados, em infecção experimental ou em infecção natural. Sendo assim, West et al. (1993), observaram que alguns dos animais em seu estudo, apresentaram epididimite caracterizada por hiperplasia epitelial moderada em alguns túbulos na cauda do epidídimo e também houve formação de cistos intraepiteliais, acompanhados de hiperplasia do epitélio do epidídimo, característico da epididimite por *B. ovis*.

Garcia-Carrillo et al. (1974), descreveram que no exame histopatológico seis dos 16 carneiros expostos á inoculação do agente, apresentaram epididimite. A intensidade da lesão inflamatória foi menor que nos animais expostos a infecção natural. Segundo o autor, a infecção experimental em carneiros demonstrou que a ocorrência de epididimite não é constante, portanto a denominação “epididimite ovina” pode não ser adequada, já que podem existir lesões testiculares muito severas com a ausência de lesões no epidídimo, semelhante ao observado neste estudo.

Também ocorreram com uma menor freqüência nos epidídimos, degeneração vacuolar das células epiteliais, degeneração hidrópica do epitélio ductal, necrose das células dos ductos, edema perivascular, atrofia por compressão, sendo alguns desses achados descritos por Jansen (1980).

Na vesícula seminal, as lesões ocorreram até os 75 dias pós-inoculação, e após esse momento, todos os animais permaneceram sem alteração. As lesões mais observadas foram infiltrado mononuclear focal discreto, congestão, hemorragia e edema. Segundo West et al. (1993), todos os animais do seu estudo apresentaram alterações histológicas na vesícula seminal, sendo a mais comum, infiltrado inflamatório.

Com relação às ampolas dos animais estudados, as alterações variaram durante todo o período do experimento, não havendo predileção da ocorrência na fase aguda ou crônica da doença, sendo o infiltrado mononuclear focal, o achado mais comum. Os achados deste trabalho discordam com os

relatados por Jansen (1980) e Foster et al. (1987) que não observaram lesões em ampolas dos animais infectados naturalmente.

Na glândula bulbouretral o achado mais comum foi infiltrado mononuclear focal/multifocal discreto, observado em sete animais. Congestão ocorreu apenas aos seis meses. Os achados deste trabalho não se assemelham com os de Foster et al. (1987) que relataram que as glândulas bulbouretrais, normalmente não apresentam alterações significativas.

Na próstata dos animais estudados as alterações observadas foram infiltrado mononuclear multifocal discreto, que ocorreu aos 105 dias e infiltrado mononuclear focal discreto, que ocorreu entre os quatro e os sete meses pós-inoculação, sugerindo que as alterações na próstata ocorrem na fase crônica da doença. Os achados não se assemelham com os observados por Foster et al. (1987), que afirmaram em seu experimento que a próstata normalmente não apresenta alterações significativas.

De forma geral neste experimento foi observado *B. ovis* no linfonodo inguinal e bexiga até os 15 dias pós-inoculação, provavelmente relacionada à drenagem linfática nos pontos de inoculação, sendo ao mesmo tempo observado já em órgãos reprodutores se mantendo de forma persistente nesses até o final do experimento. A presença do agente nos linfonodos mediastinais, linfonodos pré-escapulares e nos pulmões sugerem a possibilidade da infecção via respiratória e, de forma similar, a presença do agente aos cinco meses pós-inoculação no linfonodo parotídeo, permite a hipótese de ter ocorrido reinfecção destes animais a partir de ovinos infectados que se encontravam eliminando *B. ovis* pela urina. Ao mesmo tempo, a possibilidade de reinfecção nesses animais, via oral, é sugerida com base na presença do agente na glândula parótida, na glândula mandibular e no linfonodo mesentérico.

O acometimento de rins e da bexiga foi observado logo no início da infecção, decorrendo da infecção via ascendente a partir da inoculação intraprepucial.

A evidência de bacteremia foi observada aos quatro meses de infecção, caracterizada pela presença de *B. ovis* no baço e posteriormente no fígado.

O agente foi observado durante todo o período em linfonodo inguinal, sugerindo persistência do agente nesse local de forma similar ao sistema urinário e ao sistema reprodutivo.

Associando à disseminação e à presença do agente nos vários órgãos, observou-se alterações histopatológicas que se caracterizaram por rarefação linfóide em linfonodos e por hipoplasia de polpa branca do baço, sugerindo diminuição da capacidade de resposta imune; glomerulonefrite, sugerindo processo auto imune; e alterações reprodutivas que consistiram predominantemente por diminuição ou ausência do número de células da linhagem espermatogênica, hipoplasia de ducto epididimário, presença de espermatozoides fora do ducto e degeneração testicular refletindo a importância deste agente como responsável por baixa qualidade do sêmen e eficiência reprodutiva destes animais.

Embora o agente tenha sido evidenciado, em vários momentos, da mesma forma que as alterações histopatológicas, não foram observadas alterações macroscópicas importantes na grande maioria dos animais demonstrando que a ausência destas alterações não exclui a possibilidade de brucelose de mesma forma que não exclui a possibilidade deste animal ser uma fonte de infecção.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A infecção pela via intraprepucial e conjuntival induz a infecção persistente, caracterizada pela presença da *Brucella ovis* logo aos primeiros dias pós infecção em linfonodo regional, seguida por órgãos do sistema urinário e reprodutivo, com possível bacteremia posterior e disseminação para demais órgãos.

A infecção pela *Brucella ovis* REO 198, induziu a hipoplasia de polpa branca em baço e rarefação linfóide em linfonodos, sugerindo diminuição da capacidade de resposta imune, como possível mecanismo de persistência do agente.

A glomerulonefrite foi um achado em todos os animais infectados, indicando um possível mecanismo imunomediado, decorrente da infecção pela *Brucella ovis* REO 198.

A infecção por *Brucella ovis* REO 198, induz a lesões histopatológicas severas do sistema reprodutor do macho, sem alterações macroscópicas evidentes, reforçando a importância deste agente como responsável pela diminuição na eficiência reprodutiva dos animais e rebanho afetados.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AGECOM. Assessoria Geral de Comunicação Social do Governo do Estado da Bahia. Disponível em: **Importância econômica da criação de caprinos e ovinos.** <http://www.agecom.ba.gov.br/exibe_noticia.asp?cod_noticia=7331>.

Acesso em: 13 mar. 2006.

AGRONLINE. **Brasil quer expandir criação de caprinos e ovinos.** <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=1249>>. Acesso em 18 fev. 2008.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. Las tecnicas de laboratorio en la brucellosis. **World Health Organ. Monogr. Ser.**, v.55, p.156-160, 1976.

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

ANDREWS, E.; BENNETT, B.T.; CLARK, J.D. HOUPPT K.A.; PASCOE P.J.; ROBINSON G.W.; BOYCE J.R., Report of the AVMA panel on euthanasia, **JAVMA**, v. 202, n.2, p.229-249, 1993.

AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ALVES, F.A.L.; CLEMENTINO, I.J.; BATISTA, C.S.A.B.; AZEVEDO, A.S., Ocorrência de Anticorpos Anti-*Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Rev. Agropec. Téc.**, v.25, n.2, p.45-50, 2004.

BADIOLA, J.J.; BARBERÁN, M.; GARCIA DE JÁLON, J.A.; BASCUAS, J.A., Características reproductivas de moruecos Romanov afectados de epididimis infecciosa. Alteraciones anatomopatológicas. **Anal. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gar.**, n.17, p.69, 1982.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.95, p. 271-275, 1992.

BERMÚDEZ, J. ; RIET-CORREA, F. ; BARRIOLA, J. ; CUENCA, L.; ERRICO, F. Controle da brucelose ovina em um estabelecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16., 1978, Salvador. **Anais...**Salvador, 1978. p.23.

BIBERSTEIN, E.L.; MCGOVAN, B.; OLANDER. H.; KENNEDY, P. Epididymitis in ram. Studies in pathogenesis. **Cornell Vet.**, v. 54, n.1, p.27-41, 1964.

BLASCO, J.M. **Contribucion al estudio de la brucelosis ovina por *Brucella ovis***. 1986. 101f. Doctoral thesis. Faculdade Veterinaria Zaragoza, Spain.

BLASCO, J. M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.351-378.

BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; BARBERAN, M.; MORYÓN, I.; DIAZ, R., Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection in rams. **Vet. Microbiol.**, v.14, p.381, 1987.

BLOBEL, H.; FERNANDES, J.C.T.; MIES FILHO, A.; RAMOS, A.A.; TREIN, E.J., Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 7, p.1-3, 1972.

BROWN, G.M.; PIETZ, D.E; PRICE, D.A. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. **Cornell Vet.**, v.63, p.29-40, 1973.

BUDDLE, M.B, Studies on *Brucella ovis* (N.Sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia, **J. Hyg.**, v. 54, p. 351–364. 1956.

BUDDLE, M.B.; BOYES B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. **Aust. Vet. J.**, v. 29, p. 145 –153,1953.

BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. **JAVMA.**, v.196, n.2, p.313-315, 1990.

BULGIN, M.S. Epididymitis in rams and lambs. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.6, p. 683-690, 1990a.

- BULGIN, M.S; ANDERSON B.C., Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. **JAVMA**, v.182, p. 372-374, 1983.
- BURGESS, G.W. Ovine contagious epididymitis: a review. **Vet. Microbiol.**, v.7, p.551-575, 1982.
- CAMERON, R.D.A.; LAUERMAN, JR., LH. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infections in rams. **Vet. Rec.**, v.99, p. 231-233, 1976.
- CARDOSO, M.R.I.; COSTA, M.; BORTOLOZZO, F.P.; FERNANDES, J.C.T. Alterações da morfologia espermática em carneiros naturalmente infectados pela *Brucella ovis*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.17, p.39-48, 1989.
- CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2° ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 753p.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response, **JAVMA**, v.156, p.1726-1734, 1970.
- CEDRO, V.C.; CISALE,H.O.; DE BENEDETTI, L., Brucellosis genital ovina. Epididymitis del carnero. **Rev. Investig. Ganaderas**, v.16, p.12-18, 1963.
- CHEERS, C; YOUNG, A.M. Serum colony stimulating activity and colony forming cells in murine brucellosis: relationship to immunopathology. **Microbial. Pathog.**, v.3, p.185-194, 1987.
- CORBEL, M.J.; GILL, K.P.W.; THOMAS E.L. Methods for the identification of *Brucella*. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food,1978.
- CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; GENOVEZ, M.E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetus by polymerase chain reaction. **Aust. Vet. J.**, v.79, n.7, p. 500-501, 2001.
- CUBA-CAPARÓ, A.; MYERS, D.M. Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. **Am. J. Vet. Res.**, v.34, n.8, p. 1077-1085, 1973.

DAVIS, S.D.; TEMPLETON, J.W.; FICHT, T.A.; WILLIAMS, J.D.; KOPEC, J.D.; GARRY ADAMS, L. *Brucella abortus* in captive bison. I. Serology, Bacteriology, Pathogenesis and transmission to cattle. **J. Wildl. Dis.**, v.26, n.3, p. 360-371, 1990.

DETILLEUX, P. G., DEYOE, B. L., CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. **Infect. Immun.** 58:2320-2328, 1990.

DRAGUI-DE-BENITEZ, M.G. et al. Serological survey for ovine brucellosis in 6 districts of Corrientes Providence. Argentine. **Vet. Argent.**, v.1, n.1, p.39-40, 1984.

ENRIGHT, F.M.. The Pathogenesis of *Brucella* infection in domestic animals. In. _____ NILSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. 1 ed., Ontario: CRC Press, 1990, 301-320.

ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Arch. Med. Vet.**, vol.31, n.1, p.5-17, 1999.

ESTEIN, S.M.; BALDI, P.C.; BOWDEN, R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, p. 407-411, 2002.

FENSTERBANK, R.; PARDON, P.; MARLY, J., Efficacy of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine against *Brucella ovis* infections in rams. **Ann. Rech. Vet.**, v.13, p.185 - 190, 1982.

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

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D; HOFFMAN, D., Pathology of accessory Sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. **Aust. Vet. J.**, v. 64, n.8, p. 248-250, 1987.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D. Pathology of reproductive tracts of Merino rams in north western Queensland. **Aust. Vet. J.**, v. 66, n.8, p.262-264, 1989.

GARCÍA CARRILLO, C.; CUBA CAPARÓ A.; MYERS D.M. Susceptibilidad comparada de cabritos y carneros a la infección causada por *Brucella ovis*. Estudios serológicos, bacteriológicos y patológicos. **Gac. Vet.**, v. 36, p. 355-374, 1974.

GIL TURNES, C. Brucelose ovina. In: CORREA, R. F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. **Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 1998, p. 161-169.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet. Microbiol.**, v.90, p. 281-297, 2002.

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

HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, p.1092– 1097, 1988.

HUGGES, K.L.; CLAXTON, P.D. *Brucella ovis* infection. 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. **Aust. Vet. J.**, v.44, p.41-47, 1968.

JANSEN, B.C. The pathology of bacterial Infection of the genitalia in rams. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 47, p. 263-267, 1980.

JEBSON, J.L.; HARTLEY, W.J.; MCCLURE, T.J.; MCFARLANE, D., Pathology of Brucellosis in rams in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v. 3, p. 100-111, 1955.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6ª ed. São Paulo Manole, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999.

KATIC I. Danish Contributions to Veterinary Medicine. **World Vet. Assoc.**,v. 19 n.1, 2002.

KEID, L.B. **Diagnóstico da Brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais:** imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2 mercaptoetanol, cultivo e PCR., 2001. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KEID, L.B. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Vet. Res. Comm.**, v.31, p.951-965, 2007.

KENNEDY, P.C.; FRAZIER, L.M.; MCGOWAN, B. Epididymitis in rams: pathology and bacteriology. **Cornell Vet.**, v. 46, p. 303-319, 1956.

KOTT, R.W., HALVER, G.C., FIREHAMMER B., THOMAS V.M. Relationship between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. **Theriogenology** 29: 961-970, 1988.

KUMAR, P.; SINGH, D.K.; BARBUDDHE, S.B. Sero-prevalence of brucellosis among abattoir personnel of Delhi. **J. Commun. Dis.**, v.29, n.2, p. 131-137, 1997.

LAWRENCE, W.E. Ovine brucellosis, a review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. **Br. Vet. J.**, v.117, p. 435-446, 1961.

LAWS, L.; SIMMONS, G.C.; LUDFORD, C.G. Experimental *Brucella ovis* infection in rams. **Aust. Vet. J.** v. 48, p. 313-317, 1972.

LIAUTARD, J.P.; GROSS, A.; DORNAND, J.; KOHLER, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp.. **Microbiologia**, v.12, p.197-206, 1996.

LIMA, C.B. et al. Seroepidemiological survey of brucellosis in sheep from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Online J. Vet. Res.**, v.11, n.2, p.45-49, 2007.

LÓPEZ, G., AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; LUCERO, N.E. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. **Vet. Microbiol.**, v.105, n.3-4, p.181-187, 2005.

MAGALHÃES NETO, A.; DACROCE, O.; DA CRUZ, F.W.; FERREIRA, J.; MARTINS, S.R.; GIL-TURNES, C. Prevalência da brucelose ovina em carneiros de 50 rebanhos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16., 1991, Santos, **Resumos...**Santos, 1991.

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

MANAZZA, J. **Brucelosis ovina**. Buenos Aires: INTA, 2005. Disponível em: <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/gsa.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2007.

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCÉS, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J. M.; MARÍN, C. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Vet. Microbiol.**, v.92, p.65-72, 2003.

MARCO, J.; GONZÁLEZ, L.; CUERVO, L.A.; HEREDIA, F.B.; BARBERÁN, M.; MARÍN, C.; BLASCO, J.M. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. **Vet. Rec.**, v.135, p. 254-256, 1994.

MARÍN, C.M. **Contribución al diagnóstico sorológico, profilaxis vacunal y tratamiento de la infección por *B. ovis* em moruecos**. 1989. 147f. Doctoral thesis, Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P.; BLASCO, J.M. Efficacy of long acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p.560-563, 1989.

MARINHO, M.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do Estado de São Paulo, **Pesqui. Vet. Bras.**, v.16, p.45-48, 1996.

MCFARLANE, D.; SALISBURY, R.M.; OSBORNE, H.G; JEBSON, J.L., Investigations into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. **Aust. Vet. J.**, v. 28, p. 221- 226, 1952.

MGOWAN, B.; SCHUTZ,G. Epididymitis of rams: clinical description and field aspects. **Cornell Vet.**, n. 46, p. 277-281, 1956.

MENSE, M.G.; VAN DE VERG, L.L; BHATTACHARJEE, A,K.; GARRETT, J.L.; HART, J.A.; LINDLER, L.E.; HADFIELD, T.L.; HOOVER, D.L. Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. **AJVR**, v. 62, n.3, p. 398-405, 2001.

MENSE, M.G.; BORSCHER, R.H.; WILHELMSSEN, C.L; PITT, M.L; HOOVER, D.L. Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **AJVR**, v. 65, n. 5, 2004.

MEYER, M.E. *Brucella ovis*, In:_____. **Handbuch der bakteriellen infektionen bei tiernen**. Jena: Blobel and Scheleba, 1982. Chap. 6.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Brucelose ovina**. <www.agricultura.gov.br> Disponível em 06 mar. 2006.

MOCHMANN, H.; KOHLER, W. 100 years of bacteriology: the history of the discovery of brucellosis. 2: Discovery of the etiology of infectious abortion in cattle by the Danish veterinary pathologist Bernhard Bang and proof of the relation of "Micrococcus melitensis" and "Bacillus abortus" by the American microbiologist Alice Evans; **Z. Arztl. Fortbild. (Jena)**; v. 82, n. 8, p. 381-385, 1988.

MORIYON, I. **Estructura antigênica del genero *Brucella***. Zaragoza: Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza, p. 39-53, 1988.

NÁREZ, G.M.; APARICIO, E.D.; ALVAREZ, J.F.M.; ROMERO, F.A.; GÜEMES, F.S. Epididimitis ovina: estudios bacteriológico y serológico. **Vet. Méx.**, v.30, n.4, p.329-336, 1999.

NIELSEN, K.; DUNCAN, R.J. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.

NOZAKI, C. N. ; LIMA, K.C. ; MORAES, C.C. ; NARDI JÚNIOR, G. ; GERONUTTI, L.M.; MEGID, J. Inquérito sorológico da brucelose ovina em animais de exposição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 29., 2002, Gramado. **Anais...**Gramado, 2002.

NOZAKI, C. N. **Inquérito sorológico de brucelose ovina em cabanhas da região centro-oeste do estado de São Paulo, através das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA**; 2003, Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de métodos diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis***; 2008, Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu.

OLITZKI, A. Immunological Methods in Brucellosis Research. Part II: In:_____. **In Vivo Procedures**. Basel S. Karger, Basel, 1970, Chap 1.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis**. Ginebra: OMS, 1986. 149p. (Série de Informes Técnicos, 740).

PAOLICCHI, F. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. **Rev. Med. Vet.**, v.82, n.2, p. 86-88, 2001.

PAOLICCHI, F.A.; TERZOLO, H.R.; MALENA, R.C.; MORSELLA, C. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.23, p.155-159, 1991.

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

PAYNE, J.M. The Pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 78, p. 447-463, 1959.

PIZARRO-CERDA, J.; MERESSE, S.; PARTON, R. G.; VAN DER GOOT, G.; SOLA-LANDA, A.; LOPEZ-GONI, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. **Infec. Immun.**, v.66, p.5711-5724, 1998.

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

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**, Washington: Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1992, 274p.

QUISPE, R. Ch.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. **Rev. Invest. Vet. Perú**, v.13, n.1, p.61-66, 2002.

RAHALEY, R.S.; DENNIS, S.M. Histopathology of experimental brucellosis in rams following vaccination with *Brucella ovis*, **Aust. Vet. J.**, v. 61, n.11, p. 353-356, 1984.

RAJASHEKARA G.; GLOVER D.A.; KREPPS, M.; SPLITTER, G.A. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. **Cell. Microbiol.**, v.10, n. 7, p.1459-1473, 2005.

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

RAMOS, E.T.; POESTER, F.P.; THIESEN, S.V.; GIANNOUKALIS, M.K. Epididimite ovina em carneiros vasectomizados. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. **Anais...** Gramado, 1992. p. 88.

REDWOOD, D.W.; CORBEL, M.J. Interaction of *Brucella ovis* with ovine tissue extracts. **Vet. Rec.**, v.113, p.220, 1983.

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

ROBLES, C.A.; LA TORRACA, A; SANGHOLUZ, M.; UZAL, F.A.; EVANS, E. Brucelosis ovina en manajas Merino de la provincia de Chubut, Argentina. **Vet. Argen.**, v.10, p.458-461, 1993.

ROBLES, C.A.; UZAL, F.A.; OLAECHEA, F.V.; LOW, C. Epidemiological observations in a Corriadle flock affected by *Brucella ovis*. **Vet. Res. Commun.**, v.22, p. 435-443, 1998.

ROJAS, X. ; ALONSO, O. ; ROSENFELD, C. ; URIBE, C. ; FERNÁNDEZ, V. ; TADICH, N. Brucelosis ovina. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. **Arch. Med. Vet.**, v.22, n.1, p.55-63, 1990.

SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. **Cad. Téc. Vet. Zootec. UFMG**, n.47, p. 42-56, 2005.

SEARGEANT, E.S.G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. **N.Z.Vet. J.**, v.42, p. 97-100, 1994.

SEARSON, J.E. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. **Aust. Vet. J.**, v.64, n.4, p. 108-109, 1987.

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. **Ciênc. Anim.**, v. 13, n. 1, p.51-54, 2003.

SIMMONS, G.C.; HALL, W.T.K., Epididymitis of Rams. **Aust. Vet. J.**, v. 29, p. 33-40, 1953.

SHÄFER, I.; VAZ, A.; RAMELLA, J.; COUTINHO, G. Prevalência de carneiros reagentes à prova de imunodifusão em gel para *Brucella ovis* no Município de Lages–SC. **A Hora Vet.**, v. 17, n. 99, p. 60-61, 1997.

STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; PUGH JR, G.W.; PALMER, M.V Immune and Pathologic Responses in Mice Infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. **Infec. Immun**, v.62, n.8, p. 3206-3212, 1994.

SPENCER, T.L.; BURGESS, G.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. **Res. Vet. Sci**, v.36, p.194-198, 1984.

SZYFRES, H.; CHAPPEL, R. Bacteriological confirmation of contagious epididymitis in rams in Argentina. **Rev. Fac. Cienc. Vet.**, v. 3, p. 405-409, 1961.

TAMAYO, R.; VALENTIN, H.; SCHOEBITZ R. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. **Arch. Med. Vet.** , v.21, n. 1, p.22-28, 1989.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F. **Brucella in pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1986. chap. 20.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestical animals. **The genus Brucella**, 8th , Ed. Cornell University Press. EEUU, 1988.

TIZARD, I.R. Órgãos do Sistema Imune. In: _____. **Imunologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: ROCA, 2002, p. 76-92.

TORRES, E.D.N.; APARICIO, E.D.; QUEZADA, F.V.; TAVERA, F.T.; GUEMES, F.S. Presencia de anticuerpos contra diferentes espécies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. **Vet. Méx.**, v.28, n.3, p. 241-245, 1997.

USTUN, I.; OZCAKAR, L.; ARDA, N.; DURANAY, M.; BAYRAK, E.; DUMAN, K.; ATABAY, M.; CAKAL, B.E.; ALTUNDAG, K.; GULER, S. *Brucella* Glomerulonephritis: Case report and review of the literature, **South. Med. J.**, v.98, n.12, p. 1216-1217, 2005.

WALKER, R.L. ; LEAMASTER, B.R.; STELLFLUG, J.N.; BIRBERSTEIN E.L., A Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.188, n.4, p. 393-396, 1986.

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

WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; ALLEY, M.R.; BADCOE, L.M.; HILBINK, F.; COMPTON, C.W.R. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. **N. Z. Vet. J.**, n.41, p. 82-86, 1993.

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

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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