

# EPIDEMIOLOGIA E PROFILAXIA DA EPIDIDIMITE INFECCIOSA OVINA

## (Brucelose ovina)

Profa Dra Masaio Mizuno Ishizuka<sup>1</sup>; Dr. Lúcio Oliveira Leite<sup>2</sup>; Dr. Otávio Diniz<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Professora Titular Emérita de Epidemiologia de Doenças Infecciosas/FMVZ-USP; <sup>2</sup> CEDESA/CDA/SAA/SP

**1. CONCEITUAÇÃO:** processo infeccioso clínico ou subclínico e de tendência à crônica, causada pela *Brucella ovis* caracterizada por lesões genitais de epididimite no macho e placentite nas fêmeas com raros casos de abortamento, levada mortalidade de recém nascidos e elevada frequência de nascidos com baixo peso e baixa viabilidade condicionando à elevada mortalidade.

**Histórico:** identificada na Austrália em epidemia ocorrida em 1952 e posteriormente descrita na Europa, Américas, África e Rússia.

**Distribuição geográfica:** estima-se que seja uma doença de distribuição geográfica cosmopolita, pois tem sido notificada na Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Chile, França, Alemanha, Hungria, México, Nova Zelândia, Peru, România, Rússia, Republica Eslováquia, África do Sul, EUA e Uruguai. É bastante provável que ocorra em quase todos os países que criam carneiros.

**Agente etiológico:** *B. ovis* que apresenta características bioquímicas e sorológicas muito semelhantes a da *B. melitensis* e constituição antigênica da *B. abortus*. Estudos microbiológicos levam a considerar como sendo uma nova espécie de brucela e denominada *B. ovis*.

**Importância econômica e social:** compromete sobremaneira a produtividade do rebanho em decorrência do comprometimento da fecundidade nos machos, abortamento em fêmeas e crescente mortalidade peri-natal. . A *B. ovis* não acomete o homem e, portanto não se trata de uma zoonose.

**2. Hospedeiros:** até o presente momento foi descrita apenas em ovinos. Caprinos podem ser infectados experimentalmente e animais de laboratório são refratários.

**3. Fatores predisponentes:** a transmissão ocorre frequentemente em criações intensivas onde se observa elevada concentração de machos. Hábitos de carneiros machos são importantes para o conhecimento da epidemiologia da doença. Assim, é hábito brigas (cabeça-cabeça) entre machos em ambientes de criação intensiva ou semi-intensiva com objetivo de estabelecer hierarquia, machos perdedores “cobrem” ou lambem o prepúcio do vencedor em

sinal de submissão e estando o vencedor/dominante infectado com *B. ovis* que eliminando pelo sêmen e presente no prepúcio determina a infecção oral do perdedor (2).

**4. Patogenia:** após a penetração da bactéria no organismo de um animal susceptível por uma das portas de entrada, observa-se reação sistêmica caracterizada por febre e depressão. Em seguida, a bactéria vai localizar-se no epidídimo e células inflamatórias aparecem no sêmen depois de 2-8 semanas decorridas da infecção e a qualidade do sêmen começa a deteriorar-se. Três semanas da infecção já é possível o isolamento da bactéria a partir de sêmen de alguns reprodutores e depois de 5 semanas é isolado de todos os infectados. Lesões palpáveis de epidídimo são detectadas por volta de 9 semanas após infecção.

Nos casos agudos observa-se processo inflamatório determina aumento de volume dos órgãos afetados e pode haver obstrução dos canais do epidídimo com bloqueio de passagem de sêmen. Os testículos também podem estar afetados pelo processo inflamatório.

Nos casos crônicos a inflamação restringe-se à cauda do epidídimo e os testículos estão diminuídos de tamanho e os sintomas podem regredir, mas os reprodutores permanecem infectados.

## 5. Diagnóstico:

**5.1. Diagnóstico clínico:** ovinos afetados manifestam inflamação dos testículos e epidídimo (uni ou bilateral), facilmente palpável. É um procedimento de suspeição e somente confirmado com base em provas laboratoriais direta (bacteriológica para isolamento) e indireto (sorológica) e eventualmente prova alergia intradermopalpebral. Esta recomendação se deve ao fato da epididimite estar presente em apenas 50% dos ovinos infectados (2). Nas fêmeas se observam abortamento e endometrite. Ressalte-se que o diagnóstico clínico é extremamente inespecífico devido à existência de muitas outras bactérias causadoras de epididimite tais como *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corinebacterium psudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* e *Chlamydophila abortus* (antiga *Chlamydia pcitac*) (4, 5, 8, 10, 12, 22, 28 e 31). Lembre-se também que muitos casos de epididimite são estéreis ou traumáticas que induzem à formação de granuloma.

**5.2. Diagnóstico laboratorial direto:** consiste no isolamento bacteriológico da *B. ovis* em meios seletivos a partir de amostras de machos (tecidos ou de sêmen) ou de fêmeas

(descargas vaginais e leite). Métodos biológicos moleculares tais como a reação em cadeia de polimerase e eletroforese em gel estão sendo desenvolvidas.

**5.2.1. Colheita de amostra de animal vivo:** sêmen, suabe vaginal ou descarga vaginal e leite de animais com suspeita de doença são as amostras de leiçao. Amostras são colhidas per lavagem prepucial ou vaginal ou pelo uso de suabes e neste caso deve-se alcançar a cervix ou uretra.

**Amostras de sêmen** são mais bem obtidas recorrendo-se à eletroejaculação ou, na sua impossibilidade, recolhendo da vagina de fêmea não infectada e imediatamente após cobertura natural. Aentar para que se recolha a porção rica do esperma evitando-se uso de anti-sépticos. Frequentemente são requeridos uso de meio de transporte e condições especiais e neste caso atender as recomendações o respectivo serviço oficial de saúde animal.

**Amostra de descarga vaginal** deve ser colhida após abortamento ou parto.

**Amostra de leite** deve ser colhida depois de conveniente assepsia de todo úbere e desinfecção de tetos e desprezando os primeiros jatos de leite. É fundamental que se proceda a colheita de 10-20 mL de leite de cada teto (enviar sempre leite de ambos os quartos) em frasco estéril. Todas as amostras devem ser imediatamente refrigeradas e enviadas ao laboratório o mais breve possível.

**5.2.2. Colheita de material de necrópsia:**

**De machos:** tecidos de eleição são o epidídimo, vesícula seminal e ampola ou linfonodos inguinais.

**De fêmeas:** útero e linfonodos ilíaco e supra-mamário.

**Outros órgãos:** teste completo e visando aumentar a sensibilidade do isolamento, pode-se remeter também, fragmentos de outros órgãos como baço e outros linfonodos (cranial, escapular, pré-femural e testicular). Cordeiro mortos e placenta são úteis para isolamento e no caso de cordeiros, são importantes o conteúdo de abomaso e pulmões.

**Cuidados:** amostras destinadas ao isolamento devem ser refrigeradas ou congeladas de acordo com a recomendação e remetidas ao laboratório imediatamente após colheita. A *B. ovis* permanece viável por aproximadamente 72 horas à temperatura ambiente e o tempo de sobrevivência aumenta com na refrigeração e congelamento.

**5.2.3. Método de coloração:** esfregaços de amostras de sêmen ou secreção vaginal pode ser conduzido segundo método de Gram, de Stamp (Ziehl-Neelsen modificado), de Imunofluorescência direta ou peroxidase:

*Brucella* são coccobacilos ou pequenos cocos medindo de 0.6 a 1,5 µm de comprimento e de 0.5 a 0.7 µm de largura ((Webb et al. 1980 in OIE). Normalmente estão isolados e menos frequentemente organizados aos pares ou pequenos grupos. A morfologia da *Brucella* é muito constante exceto em culturas velhas onde se

apresentam pleomórficas. As brucelas são imóveis, não forma esporos nem flagelos ou pili ou cápsulas. São Gram negativas e usualmente revelam coloração bipolar. Não são ácido resistentes, porém é resistente à descoloração por ácidos fracos e coram-se em vermelho pelo método de Stamp. Este procedimento de examinar decalques de órgãos ou esfregaços previamente fixados pelo calor ou álcool é rotineiro e as brucelas coram-se em vermelho sobre fundo azul.

*Resultado:* a presença de microrganismo intracelular com morfologia compatível com *Brucella* ou imunoespecificamente corado (fluorescência ou peroxidase), é evidência de brucelose. A coloração de Stamp de material suspeito (de trato genital de machos, linfonodos inguinais, placenta e contrúdo de abomaso e pulmões de fetos) permite um rápido diagnóstico presuntivo. Estes métodos apresentam baixa sensibilidade quando se emprega leite ou produtos lácteos porque a bactéria está presente em pequeno número e a interpretação está frequentemente comprometida pela presença de glóbulos de gordura. Cautela na interpretação do método de Stamp que pode resultar em falsos positivos devido a outros agentes causadores de abortamento (*Chlamydomphila abortus* or *Coxiella burnetii*) e que são dificilmente diferenciados das brucelas e há que se confirmar pelo isolamento. Prova de PCR está sendo rotineiramente empregada na demonstração do agente desta doença em vários substratos ((de Long et al, 1979 in OIE).

**5.2.4. Cultura bacteriana:** o isolamento é o método preferencial de diagnóstico e consiste em semear em placa contendo meio apropriado. Amostras de sêmen, secreção vaginal ou de leite podem ser diretamente semeados em placas, incubadas a 37° C a uma atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. Fragmentos de tecidos podem ser macerados em Graal com pequena quantidade de solução salina estéril ou solução salina fosfatada tamponada. Crescimento bacteriano é observado em 3-4 dias e um resultado negativo somente poderá ser confirmado após 7 dias. Colônias de *B. ovis* (0,5-0,7 mm) são visualizadas depois de 3-4 dias de incubação e apresentam-se como colônias Rugosas, arredondadas, brilhantes e convexas.

**Meios de cultura:** *B. ovis* crescem em meios não seletivos como o de agar sangue enriquecido com 10% de soro ovino ou bovino ou meio de agar sangue contendo 5-10% de sangue estéril de ovino. Nestes meios, crescem bactérias contaminantes. O meio seletivo mais recomendado é o de Thayer-Martin modificado (3,13).

**Identificação e tipificação:** colônias são não hemolíticas, circulares, convexas e rugosas quando examinadas sob iluminação oblíqua e positivas ao teste de acriflavina (1,7). Não tem atividade de uréase, não reduz nitrito nem nitrato, oxidase negativa, catalase positiva, não produz H<sub>2</sub>S. Cresce em meio contendo fucsina e tionina e não cresce em meio com violeta de metila. A maioria dos isolados de *B. ovis* podem ser corretamente identificados com base nas características de crescimento,

visualização de esfregaços corados e submetidos a luz obliquamente refletida, coloração de Stamp e testes de catalase, oxidase, uréase e acriflavina. A identificação definitiva deve ser conduzida por laboratórios com experiência em identificação e tipificação de *Brucella*. A *B. ovis* pode ser diferenciada de outras brucelas pela prova de padrão de cadeia de restrição polimerase (PCR-RFLP) para os genes *omp2a*, *omp25* e *omp31* que codificam as proteínas maiores de membrana.

**5.2.5. Testes sorológicos:** as prova mais eficazes e mais empregadas são a de Fixação de Complemento (FC), dupla imunodifusão em gel de agar (AGID) e ELISA indireto. Vários países vêm adotando diferentes métodos sorológicos para detecção de anticorpos contra *B. ovis*, no entanto a prova padrão é ainda a FC . o teste de AGID oferece resultados de sensibilidade comparáveis com o da FC e é mais prática (simples) para ser executada.

**6. Cadeia epidemiológica:** a propagação e manutenção da doença em população ovina ocorrem pela participação ativa dos machos que transferem a bactéria para as fêmeas através do coito. Machos uma vez infectados, assim permanecem por toda a vida. Nas fêmeas, a bactéria não permanece por muito tempo em seu organismo e assim seu papel como fonte de infecção é menos importante quando comparado como o do reprodutor. É também observada transmissão de carneiro para carneiro através contacto homossexual quando os machos dominantes “cobrem” os dominados. Muitos autores aventam a possibilidade de transmissão por alimentos contaminados com urina, pisos contaminados com sêmen ou urina e lambedura de prepúcio. É preciso muita cautela em considerar essas possibilidades de transmissão. Assim:

**Fonte de infecção:**

**Macho:** na condição de portador em incubação, doente típico (manifestação aguda e crônica). Machos uma vez infectados, assim permanecem por toda a vida.

**Fêmeas:** na condição de doente típico.

**Vias de eliminação:**

**Macho:** eliminam pelo sêmen e secreção prepucial.

**Fêmeas:** eliminam pelas descargas vaginais e pelo leite.

**Vias de transmissão:** a doença é transmitida principalmente pelo contágio direto (coito e lambedura). A transmissão pela ingestão de alimento contaminado com sêmen e urina tem sido relatada e considerado na infecção de machos, mas não tem possível reproduzir a infecção de fêmeas por este mecanismo. .

**Porta de entrada:** mucosa do aparelho reprodutor é a principal e secundariamente tem-se a mucosa oral e eventualmente a retal.

**Susceptíveis:** apenas ovinos são susceptíveis e esta susceptibilidade está relacionada com a maturidade sexual.

## 7. Profilaxia:

**7.1. Medidas de profilaxia relativas às fontes de infecção:** identificação (diagnóstico clínico e laboratorial) e sacrifício é a medidas mais recomendada em áreas de baixa prevalência. Não existe tratamento.

**7.2. Medidas de profilaxia relativas aos susceptíveis:** em futuro próximo, a vacina poderá vir a ser um forte instrumento profilático e com resultados a médio prazo para o controle da doença em áreas de elevada prevalência. A vacina viva de *B. melitensis* Rev 1 é a melhor dentre as disponíveis. Uma única dose de 1 mL ( $10^9$  unidades formadoras de colônia) por via subcutânea ou 25-30  $\mu$ L por via conjuntival em fêmeas de 3-5 meses de idade confere imunidade de longa duração. A vacinação por via conjuntival apresenta a vantagem de minimizar a intensidade da reação sorológica ((Blasco,1990 in OIE). Quando aplicada em animais na idade recomendada, as reações colaterais são mínimas. Não existem informações suficientes que recomende a vacinação de reprodutores adultos. A restrição quanto ao emprego de Rev 1 é a impossibilidade de se utilizar em países livres de *B. melitensis* e endêmica para *B. ovis*. A vacina RB51 não demonstrou eficácia na proteção contra *B. ovis*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Alton G.G. (1990). *Brucella melitensis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K.H. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 383–409.
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus, R.D. & Verger J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
3. Bardenstein S., Mandelboim M., Ficht T.A., Baum M. & Banai M. (2002). Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its *omp2* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1475–1480.
4. Blasco J.M. (1992). Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants. In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 272–277.
5. Blasco J.M. (1997). A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, **31**, 275–283.
6. Blasco J.M., Garin-Bastuji B., Marin C.M., Gerbier G., Fanlo J., Jimenez De Bagues M.P. & Cau C. (1994). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, **134**, 415–420.
7. Bosseray N. (1991). *Brucella melitensis* Rev.1 attenuated vaccine: Stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*, **19**, 355–363.
8. Bosseray N. (1992). Le vaccin Rev.1: dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques. In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 182–186.
9. Bosseray N. (1993). Control methods and thresholds of acceptability for anti-*Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 121–128.
10. Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N. & Zygmunt M.S. (2001). Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diag Lab. Immunol.*, **8**, 772–775.
11. Cloeckaert A., Debbarh H.S., Vizcaino N., Saman E., Dubray G. & Zygmunt M.S. (1996). Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep.

*FEMS Microbiol. Lett.*, **140**, 139–144.

12. Cloeckaert A., Grayon M. & Grépiant O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, **20**, 2546–2550.
13. Debbarh H.S., Zygmunt M.S., Dubray G. & Cloeckaert A. (1996). Competitive ELISA using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* bp26 protein to evaluate antibody response in infected and *B. melitensis* Rev1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.*, **53**, 325–337.
14. Díaz-Aparicio E., Marín C., Alonso B., Aragón V., Pérez S., Pardo M., Blasco J.M., Díaz R. & Moriyón I. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1159–1165.
15. Garin-Bastuji B., Blasco J.M., Grayon M. & Verger J.M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.*, **29**, 255–274.
16. Grillo M.J., Bosseray N. & Blasco J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
17. Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Brucellosis (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
18. MacMillan A. (1990). Conventional serological tests. *In: Animal Brucellosis*, Nielsen K.H. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 153–197.
19. Marín C.M., Moreno E., Moriyón I., Díaz R. & Blasco J.M. (1999) Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 269–272.
20. Rossetti O., Arese A., Boschioli L. & Cravero S. (1996). Cloning of *Brucella abortus* gene and characterisation of expressed 26 kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 165–169.
21. World Health Organization (1977). Requirements for *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccine (Live – for veterinary use). World Health Organization (WHO) Technical Report Series No. 610, 28th Report, Annex 4. WHO, Geneva, Switzerland, 85–97