

ESTUDOS SÔBRE A ETIOLOGIA DA EPIDIDIMITE OVINA NO RIO GRANDE DO SUL¹

II. BLOBEL², J. C. T. FERNANDES³, A. MIES FILHO⁴, A. A. RAMOS⁵ e E. J. TREIN⁶

SINOPSE.— Um germe semelhante à brucela foi isolado em 9 dentre 25 carneiros que apresentavam epididimite. Aparentemente, a mesma bactéria foi cultivada do conteúdo do estômago de um dentre 17 ovinos natimortos. Foi possível produzir a epididimite em condições experimentais em todos os seis carneiros inoculados, usando para isso 5 culturas tomadas ao acaso dentre as 9 isoladas bem como a cultura proveniente do natimorto.

Nos exames histopatológicos dos casos examinados, verificou-se tratar-se de processos inflamatórios nitidamente granulomatosos, sem no entanto apresentarem especificidade.

INTRODUÇÃO

A epididimite tem sido observada em carneiros desde muitos anos em algumas regiões de criação ovina.

Na Austrália, Simmons e Hall (1953) isolaram uma bactéria de epidídimos infetados de carneiro, conseguindo transmitir a doença. Descreveram-na como sendo um germe "semelhante à brucela", mas não conseguiram classificá-lo. Buddle e Boyes (1953) estudaram pormenorizadamente um coco-bacilo gram-negativo que causava uma infecção genital em ovinos na Nova Zelândia e concluíram tratar-se de uma *Brucella* sp., provavelmente uma mutante de *Brucella melitensis*. Como resultado deste e de trabalho subsequente, Buddle (1956) concluiu que se deveria dar ao germe em apreço uma denominação específica tendo proposto o nome de *Brucella ovis*. Kennedy *et al.* (1956) isolaram o mesmo tipo de bactéria de carneiros com epididimite nos Estados Unidos. A semelhança deste germe com *Hemophilus* sp. foi evidenciada. Meyer e Cameron (1956) estudaram esta bactéria e sugeriram sua classificação no gênero *Neisseria*. Van Rensburg *et al.* (1958) comunicaram o isolamento de uma bactéria, semelhante a brucela, de carneiros com epididimite na África do Sul. Hartley *et al.* (1954) infetaram ovelhas prenhes com essa bactéria e conseguiram seu isolamento a partir das membranas fetais infetadas bem como do conteúdo estomacal e pulmões do feto. McGowan *et al.* (1961) também reisolaram esse germe das membranas fetais e de fetos de ovelhas prenhes infetadas experimentalmente. Os ci-

tados autores denominaram este microrganismo de REO (ram epididymitis organism). Watts (1955) e Wellington (1955), em estudos separados, comunicaram o isolamento deste microrganismo a partir do leite de ovelhas infetadas.

Extensivos estudos sobre a epididimite ovina têm sido levados a efeito mais recentemente na Argentina (Cedro *et al.* 1963) e no Peru (Moro 1962). Baynes e Simmons (1960) isolaram uma bactéria, "*Actinobacillus seminis*", de carneiros com epididimite na Austrália. Aparentemente a mesma bactéria foi isolada posteriormente por Livingston e Hardy (1964) também de epidídimos de ovinos infetados.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação do agente causal

Sêmen, obtido por eletro-ejaculação, e epidídimos infetados foram cultivados em agar sangue ou agar soro, consistindo em 1 volume de sangue ovino em solução de Alsever (Kabat & Mayer 1961) e 9 volumes de meio base de agar sangue⁷. O agar soro era composto de 5 partes de soro ovino previamente esterilizado por filtração em filtro Seitz e 95 partes de meio base de agar sangue. Os meios inoculados foram incubados a 37°C sob reduzida tensão de oxigênio em um dessecador de vidro. As condições de microaerofilia foram produzidas pela colocação de uma vela acesa dentro do dessecador antes de seu fechamento hermético.

Caracterização das bactérias

O tipo de colônia foi estudado com o auxílio do teste de acriflavina (Alton & Jones 1963). A bacterioscopia foi executada com os seguintes métodos de coloração: Ziehl-Nielsen modificado (Edgard & Macdiarmid 1956), Gram (Bier 1962) e Köster modificado (Buddle & Boyes 1953). Fermentações de glicose, inositol, lactose, maltose, manitol, rarnnose, sacarose e trealose foram determinadas em meio de peptona com 10% de soro ovino. A concentração dos açúcares respectivos no meio foi de 1%. A leitura final foi tomada após uma semana de

¹ Recebido 30 out. 1969, aceito 15 jan. 1970.

Este estudo constitui parte de um programa do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Sul (IPEAS) e do convênio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com a Universidade de Wisconsin, recebendo auxílio parcial através dos fundos da U.S. Agency of International Development.

² Diretor do Institut für Bakteriologie und Immunologie, Universität Giessen, 63 Giessen, Frankfurter Str. 87, Alemanha Ocidental, anteriormente Professor de Ciência Veterinária da Universidade de Wisconsin, Madison, Wis., U.S.A.

³ Professor da Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV) da UFRGS, anteriormente Veterinário do IPEAS.

⁴ Veterinário do Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura, e Assistente da FAV da UFRGS.

⁵ Veterinário do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Campo Grande, CB, ZC-26, anteriormente Veterinário do IPEAS.

⁶ Veterinário, Prof. Catedrático da FAV da UFRGS.

⁷ Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

incubação sob reduzida tensão de oxigênio a 37°C. Produção de indol e H₂S, os testes de vermelho de metila e de Voges-Proskauer, redução de nitratos, as provas de catalase e urease foram estudadas segundo processos padrão (Society of American Bacteriologists 1957).

Testes de sensibilidade aos antibióticos foram efetuados sobre o agar sangue com a utilização de discos comerciais de alta concentração, com 10 unidades de penicilina, 10 µg de estreptomina, 30 µg de cloromicetina, 30 µg de kanamicina, 15 µg de eritromicina, 30 µg de tetraciclina, 30 µg de novobiocina e 30 µg de neomicina.

Testes de fixação de complemento

Para a preparação do antígeno, semearam-se as bactérias semelhantes a brucela em placas de Petri contendo agar sangue ovino ou agar soro ovino por 3 dias a 37°C sob as condições microaeróbicas descritas acima. As bactérias foram obtidas por lavagem das placas com solução salina fisiológica estéril, usando-se 3 ml por placa. Logo após, a suspensão foi centrifugada aproximadamente a 8.000 x g a 5°C. O sobrenadante foi eliminado. O sedimento bacteriano foi ressuspenso no volume original de solução salina fisiológica estéril sendo submetido a fervura por 10 minutos. A suspensão foi a seguir centrifugada aproximadamente a 8.000 x g a 5°C. O sobrenadante se constitui no antígeno para a fixação do complemento. Como apresentasse atividade anticomplementar na concentração original, necessitou ser diluído a 1:5 em solução salina fisiológica, e nesta diluição foi usado no teste final.

No teste de fixação de complemento foram incubados 0,2 ml do antígeno diluído em presença do complemento com 0,2 ml de soro a 37°C em banho-maria. Os soros haviam sido previamente aquecidos a 56°C por 30 minutos. O complemento foi titulado antes de cada teste. Uma unidade de complemento em um volume de 0,15 ml foi aplicada. Após a execução do "sistema de teste", que consistiu na incubação, por 30 minutos, do antígeno, do soro e do complemento, adicionou-se o "sistema indicador". Este último compreendia uma mistura de volumes iguais de uma suspensão de glóbulos vermelhos de ovino a 2,5% em solução salina e de hemolisina, 4 unidades por dose. 0,5 ml do sistema indicador foram adicionados a cada tubo e a incubação prosseguiu por um período adicional de outros 30 minutos, ao fim do qual o teste foi considerado terminado. Na fixação de complemento de um soro na diluição 1:10 ou mais é considerado positivo.

Soro-aglutinação rápida para Brucella

O antígeno para o teste de aglutinação rápida em placa de vidro (Hipólito & Freitas 1963) foi recebido do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", de Guaíba, Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

Isolamento das bactérias

Foram isoladas bactérias semelhantes a brucela de 8 epidídimos provenientes de 24 carneiros que apresentavam lesões clínicas de epididimite. Lesões macroscópicas típicas são mostradas na Fig. 1. Os carneiros procediam de fazendas situadas nos municípios de Bagé e Jaguarão, Rio Grande do Sul. As modificações patológicas

serão descritas em outro trabalho. O sêmen de todos os 24 carneiros era necrospérmico ou azoospérmico e continha muitos leucócitos. Em aditamento, o agente semelhante a brucela foi isolado do sêmen de um carneiro com epididimite internado na Clínica Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O soro sanguíneo deste animal deu resultado positivo quando submetido ao teste de fixação de complemento. Aparentemente a mesma bactéria foi cultivada a partir do conteúdo estomacal de um dos 17 ovinos natimortos, procedentes de uma fazenda próxima de Bagé.

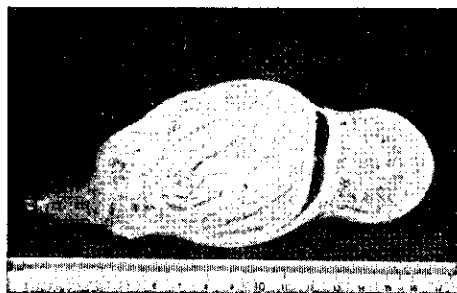


FIG. 1. Epididimite ovina. Lesão macroscópica típica.

Características da bactéria semelhante a brucela

As bactérias eram imóveis, coco-bacilos isolados ou em pares, gram-negativos e resistentes à descoloração com ácidos fracos na coloração de Ziehl-Nielsen modificada (Edgar & Macdiarmid 1956). Quando tratadas pelo método de Köster modificado (Buddle & Boyes 1953) tomaram a coloração rosa. O crescimento se verificou apenas nos meios contendo sangue ou soro e sob condições de microaerofilia. As colônias eram visíveis após incubação de 2 dias a 37°C e mediam aproximadamente 0,5 mm. Após 5 dias de incubação aumentaram em tamanho até 1,5 mm de diâmetro. Apresentavam-se convexas e de cor branco-acinzentada. No teste de acriflavina o resultado foi positivo.

As bactérias semelhantes a brucela não produziram ácido a partir da glicose, inositol, lactose, maltose, manita, ramnose, sacarose e trealose. Também não reduziram os nitratos nem produziram gás sulfídrico e indol. Os testes da urease, do vermelho de metila e de Voges-Proskauer foram negativos. O teste da catalase foi fortemente positivo.

As bactérias mostraram-se resistentes aos seguintes antibióticos: penicilina, cloromicetina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina, novobiocina e neomicina.

Mostraram-se sensíveis à estreptomina e cloromicetina.

A inoculação por via intraperitoneal não provocou modificações patológicas visíveis na cobaia.

As bactérias não foram aglutinadas por soro bovino positivo para *Brucella abortus* ao título de 1:800, na prova rápida, em placa de vidro.

Reprodução da doença

A epididimite foi provocada experimentalmente pela inoculação do germe semelhante a brucela em todos os seis carneiros utilizados para a prova. A infecção experimental foi estabelecida pela inoculação de aproxima-

damente 10⁶ bactérias em 1 ml de solução fisiológica em cada epidídimo. O número de bactérias foi determinado previamente pela cultura de uma suspensão bacteriana do germe em estudo, diluída 10 vezes e semeada em duplicata em agar sangue ovino. Cinco das seis culturas usadas para a infecção experimental foram isoladas de diferentes carneiros e a sexta do conteúdo estomacal de feto ovino abortado. Os animais infetados apresentaram epididimite dentro de uma semana da inoculação. O germe semelhante a brucela foi reisolado do sêmen de todos os seis carneiros infetados, oito semanas após a infecção experimental. Foi possível a cultura a partir do sêmen de um animal cinco meses após a inoculação. Os soros de todos os animais infetados continham anticorpos de fixação de complemento da diluição 1:10 e em diluições maiores. Os anticorpos persistiram por muitos meses. De outro lado, o sêro não aglutinou o antígeno *B. abortus* no teste rápido, em placa de vidro.

Histopatologia

A intensidade das alterações encontradas ao exame histopatológico é variável de caso para caso e, mesmo, dentro de cada caso. As lesões são observadas tanto no estroma (tecido intertubular) como nos túbulos, especialmente no epitélio tubular.

No estroma, as alterações mais constantes consistem na presença de aglomerados de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) localizados em geral nas camadas adjacentes ao epitélio tubular. Os capilares sanguíneos, nestes locais, apresentam dilatações ligeiras, e, muitas vezes, nota-se um edema local com localização perivascular. Em outros locais há presença de piócitos, em quantidades variáveis, formando acúmulos em geral de pequenas dimensões. Quando estes piócitos infiltram as paredes dos túbulos ocasionam a destruição de seu epitélio do que resulta o extravasamento do conteúdo tubular para o interstício produzindo aí granulomas inespecíficos a que Jubb e Kennedy (1963) chamaram de "granulomas espermáticos". Estes granulomas evoluem para fibrose intensa e vão até a formação de um tecido cicatricial.

Para o lado dos túbulos, nota-se, em quase todos os casos, a presença de cistos epiteliais, degeneração hidrópica das células epiteliais e hiperplasia papilar. Muitas vezes é patente a estagnação do conteúdo tubular ocasionada provavelmente pela intensa fibrose observada no estroma. Outras vezes, na presença de acúmulos de piócitos, o epitélio mostra-se destruído, ocasionando o extravasamento do conteúdo tubular para o tecido intersticial.

Discussão

Os estudos descritos revelaram que o germe semelhante a brucela foi a causa da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. É de interesse epizootológico salientar que, aparentemente, a mesma bactéria foi isolada do conteúdo gástrico de um feto natimorto. Tal fato indica que a ovelha pode abrigar a bactéria em seus órgãos genitais e pode ainda abortar como resultado de uma infecção provocada por este microrganismo.

Se o germe isolado, semelhante a brucela, pertence ao gênero *Brucella* é ponto ainda discutível.

Não houve reação cruzada com *B. abortus*. Além disso, a bactéria isolada do epidídimo infetado não decom pôs a uréia. O gênero *Hemophilus* (Kennedy *et al.* 1956) e *Actinobacillus seminis* apresentam importância para o diagnóstico diferencial. As características da bactéria passíveis de determinação com os recursos disponíveis foram apontadas. Embora possam ser úteis para estudos comparativos futuros, não são suficientes para uma classificação definitiva do germe encontrado por nós.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ajuda dada pelos Drs. J.A.P. Schenk, O.T.G. Prado e L.D. Vasconcellos, do Ministério da Agricultura, os dois primeiros da sede do IPEAS e o terceiro da Fazenda Experimental de Bagé, RS.

REFERÊNCIAS

- Alton, G.C. & Jones, L. 1963. Laboratory techniques in brucellosis. Animal Health Branch Monograph n.º 7, FAO, Rome.
- Baynes, I.D. & Simmons, G.C. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*, n. sp. Aust. vet. J. 36:454-459.
- Bier, O. 1964. Bacteriologia e imunologia. 11.ª ed. Ed. Melhoramentos, São Paulo, p. 17-19.
- Buddle, M.B. 1956. Studies on *Brucella ovis* n. sp. A cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. J. Hyg. 54:1-351.
- Buddle, M.B. & Boyes, B.W. 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust. vet. J. 29: 145-153.
- Cedro, V.C.F., Cisale, H.O. & Benedetti, L.M.E. 1963. Brucelosis ovina genital. Ser. tec. (nueva) n. 21, Secr. Est. Agric. y Ganaderia, Centro Investnes agropec., B. Aires, Argentina.
- Edgar, D.G. & Macdiarmid, H.J. 1956. An improved method for the collection and evaluation of ram semen. N. Z. vet. J. 4:20-24.
- Hartley, W.J., Jebson, J.L. & Macfarlane, D. 1954. The artificial infection of sheep with *Brucella*-like organisms. Part I. The artificial infection of ewes. N. Z. vet. J. 2:80-89.
- Iipólito, O. & Freitas, M.G. 1963. Doenças infeto-contagiosas dos animais domésticos. Ed. Melhoramentos, S. Paulo, p. 75.
- Jubb, F.V.K. & Kennedy, F.C. 1963. Pathology of domestic animals. Academic Press, New York, vol. 1, p. 371-376.
- Kabat, E.A. & Mayer, M.M. 1961. Experimental immunochemistry. 2nd ed. Ch. C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, p. 149.
- Kennedy, P.D., Franzier, L.M. & MacGowan, B. 1956. Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. Cornell Vet. 46: 303-309.
- Livingston, C.W. & Hardy, W.T. 1964. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. Am. J. vet. Res. 25: 660-663.
- MacGowan, B., Biberstein, E.L., Harrold, D.R. & Robinson, E.A. 1961. Epididymitis in rams. The effect of the ram epididymitis organism (REO) on the pregnant ewe. 65th Annual Meeting U.S. Livestock San. Ass., p. 291-296.
- Meyer, M.E. & Cameron, H.S. 1956. Studies on the etiologic agent of epididymitis in rams. Am. J. vet. Res. 17:495-497.
- Moro, M. 1962. Enfermedades infecciosas de los ovinos en el Perú. Revta Fac. Med. Vet., Lima, Perú, p. 7-39.
- Simmons, G.G. & Hall, W.T.K. 1953. Epididymitis of rams. Aust. vet. J. 29:33-40.
- Society of American Bacteriologists 1957. Manual of microbiological methods. McGraw-Hill, New York, p. 153-166.
- Van Rensburg, S.W.J., Van Heerden, K.M., Roux, D.J. & Snyders, A.J. 1958. Infectious infertility in sheep. J. S. Afr. vet. med. Ass. 29:223-233.
- Watts, P.S. 1955. Genital infections of sheep with particular reference to *Brucella*-like organisms. Aust. vet. J. 31:1-6.
- Wellington, N.A.M. 1955. Epididymitis in rams. Aust. vet. J. 31:10-11.

ABSTRACT.- Blobel, H., Fernandes, J.C.T., Mies Filho, A., Ramos, A.A. & Trein, E.J. 1972. *Etiology of ovine epididymitis in Rio Grande do Sul*. *Pesq. agropec. bras., Sér. Vet.*, 7:1-4. (Inst. Pesq. Agropec. Sul, Caixa Postal E, Pelotas, RS, Brazil)

Brucella-like bacteria were isolated from nine out of 25 rams with epididymitis. Cultured stomach contents of one out of 17 stillborn lambs yielded bacteria that were apparently identical. Epididymitis was produced in all of six experimentally infected rams using five cultures randomly selected from the nine cultures isolated from rams and the bacteria isolated from the stillborn lambs. This was accepted as evidence that the brucella-like bacteria were the cause of ovine epididymitis in Rio Grande do Sul.

Histopathologic examination showed inflammatory changes with granulomatous characteristics, however, without specificity.