

Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL

Agglutinins against *Brucella canis* and *Brucella abortus* and risk factors for *Brucella canis* infected dogs examined in private veterinary clinics in the city of Maceió-Alagoas

Wagner José Nascimento Porto,* José Wilton Pinheiro Junior,** Rinaldo Aparecido Mota***

Resumo

Objetivou-se com este estudo determinar a frequência de aglutininas anti-*B. canis* e *Brucella abortus*, além de identificar possíveis fatores de riscos associados à infecção em cães atendidos nas clínicas veterinárias da Cidade de Maceió, Alagoas. Foram utilizados 90 animais, sendo 28 machos e 62 fêmeas de diferentes raças e faixa etária variável. Para pesquisa de aglutininas anti-*Brucella canis* utilizaram-se as provas de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e imunodifusão com 2-mercaptoetanol (IDGA/2-ME) e para pesquisa de aglutininas anti-*Brucella abortus* utilizou-se o teste do Antígeno Acidificado (AAT). Dos 90 animais analisados quatro (4,4%) foram positivos no IDGA, dos quais três (75,0%) foram positivos ao IDGA/2-ME, enquanto um (25,0%) foi negativo. Ao teste do AAT nenhum animal foi soro-reagente. A análise de concordância entre os testes utilizados foi $K=0,851$. Não foi observada associação significativa para as variáveis faixa etária ($p=0,426$) e sexo ($p=0,678$) e apenas a variável raça apresentou associação significativa para infecção por *Brucella canis* com resultado do *odds ratio* 0,04 ($p=0,025$; IC 95% 0,00; 1,01). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a infecção por *Brucella canis* ocorre na Cidade de Maceió-AL e que medidas de controle e profilaxia devem ser empregadas para evitar a disseminação do agente para criatórios livres da doença.

Palavras-chave: brucelose, epidemiologia, animais de companhia.

Abstract

This study aimed to determine the frequency of agglutinins against *Brucella canis* and *Brucella abortus*, and to identify possible risk factors associated with infection in dogs examined in private veterinary clinics in the city of Maceió-Alagoas. For the purpose of this study we used 90 animals: 28 males and 62 females of various breeds and ages. Immune Diffusion in Gel Agar (IDGA) and immune diffusion with 2-Mercaptoethanol (IDGA/2-ME) were used to investigate the presence of agglutinins against *B. canis*, and the Acidified Antigen Test (AAT) was used to investigate agglutinins against *B. abortus* (AAT). Out of 90 animals four (4.4%) had positive IDGA; with three (75.0%) testing positive on the IDGA/2-ME and one was negative on the IDGA/2-ME. No animal tested positive on the AAT. The concordance analysis between the tests was $K=0.851$. No significant association was noticed for age group ($p=0,426$) and gender ($p=0,678$). The only variable with significant association for *B. canis* infection was breed, with 0.04 *odds ratio* ($p=0.025$; IC 95% 0.00; 1.01). The results of this study show that *B. canis* infection is present in the city of Maceió-AL, and that control and preventive measures must be enforced to prevent dissemination into disease-free populations.

Keywords: brucellosis, epidemiology, companion animals.

Introdução

A urbanização e mudanças sociais da população humana nas últimas décadas favoreceram o aumento da população canina nos países em desenvolvimento. Esse aumento, associado às relações sentimentais/emocionais do homem com esta espécie tem implicações nos problemas de saúde pública, pois o animal pode ser responsável pela transmissão de várias zoonoses, entre elas, a brucelose (Souza et al., 2002).

A brucelose animal assume importância significativa entre as doenças ou infecções naturalmente transmissíveis dos animais ao homem, e vice-versa, na medida em que afeta a saúde animal, a economia da produção pecuária, a saúde pública e a disponibilidade de proteína animal para as necessidades da população (Acha e Syfres, 1989).

A infecção de cães por *Brucella canis* é relatada em praticamente todos os países, com prevalência variável segundo a

* Professor de Parasitologia, Universidade Estadual de Alagoas, Av. Governador Luiz Cavalcante, s/n, Arapiraca, AL, CEP 57312-270

** Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco

*** Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, PE. CEP 52171-900 rinaldo.mota@hotmail.com

região e o método de diagnóstico empregado, podendo-se afirmar que apresenta distribuição mundial (Carmichael e Greene, 1993). Quanto às alterações clínicas compatíveis com a brucelose canina, os sintomas e lesões estão relacionados com o aparelho reprodutor de machos e fêmeas (Gomes et al., 1999) que tenham atingido a maturidade sexual (Carmichael e Greene, 1993).

O diagnóstico clínico da infecção é bastante difícil devido à ausência de sinais específicos e a maioria dos cães serem assintomáticos (Cavalcanti et al., 2006). Em função da dificuldade e da baixa especificidade do diagnóstico clínico, a confirmação da brucelose canina deve ser realizada por métodos laboratoriais (Minharro et al., 2005). Ainda segundo esses autores, o isolamento e a identificação da *B. canis* é um método de alta especificidade diagnóstica, pois demonstra o agente etiológico da doença, mas sua sensibilidade pode ser baixa em detrimento de vários fatores como eliminação intermitente da bactéria, material mal coletado e mal conservado, além da utilização de antibióticos.

Dessa forma, os testes sorológicos representados pelas provas de soroaglutinação lenta, rápida e a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) são os métodos freqüentemente utilizados no diagnóstico da doença.

Considerando a importância dessa enfermidade, além da escassez de dados na cidade de Maceió, Alagoas, objetivou-se com esse estudo determinar a freqüência de aglutininas anti-*B. canis* e *B. abortus* em cães, além de identificar possíveis fatores de riscos associados à infecção.

Material e métodos

Foram utilizados 90 animais, sendo 28 machos e 62 fêmeas de diferentes raças e faixa etária variável, atendidos em clínicas veterinárias da cidade de Maceió, Alagoas. Realizou-se anamnese para verificar a presença ou ausência de sinais de distúrbios reprodutivos. Destes animais, 31 apresentavam sinais clínicos sugestivos de brucelose e 59 encontravam-se clinicamente sadios.

As amostras foram obtidas por meio da venopunção da cefálica e foram armazenadas em tubos de ensaio, identificados e encaminhados ao Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco; para obtenção do soro, centrifugou-se por dez minutos a 900 giros e estes foram armazenados em microtubos e submetidos ao congelamento até o momento das análises.

Para realização das provas de IDGA e IDGA/2-ME utilizou-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis* (amostra Reo 198) fornecido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR. Na preparação do gel utilizou-se agarose (DIFCO) a 0,5%, dissolvido em solução salina a 10% com tampão de Sorensen, ajustando-se o pH final da solução para 8,3. A distribuição do gel, perfuração dos poços, leitura em placas de Petri descartáveis e acondicionamento em câmara úmida, obedeceram às especificações do fabricante do antígeno.

Para confirmação da infecção por *B. canis* os soros foram submetidos à prova IDGA/2-ME, realizando-se tratamento com 0,2M de 2-Mercaptoetanol. Dessa forma, ao volume de 100µL de soro foram adicionadas 100µL da solução de 2-ME a 0,2M, permanecendo em reação durante 30 minutos (KEID, 2001). Após esse período, 25µL dos soros tratados foram

submetidos à IDGA seguindo o protocolo preconizado pelo TECPAR.

Para pesquisa de aglutininas anti-*Brucella abortus* os soros foram submetidos ao teste do AAT de acordo com Alton et al. (1988).

A análise para comparação dos testes sorológicos IDGA e IDGA/2-ME foi baseada no estudo de concordância entre os métodos por meio do coeficiente *Kappa* de acordo com Truesfield (1986).

Para o cálculo da freqüência dividiu-se o número de animais sorologicamente positivos ao teste IDGA/2-ME pelo número de animais amostrados, utilizando-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absoluta e relativa. Para o estudo da associação entre a soropositividade e as variáveis analisadas (faixa etária, raça, sexo), utilizou-se estatística inferencial por meio do teste Exato de Fisher e os intervalos foram obtidos com confiabilidade de 95%. O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. O programa utilizado para a obtenção da análise estatística foi o EpiInfo versão 6.02 (Dean et al., 1994)

Resultados e discussão

Dos 90 animais analisados, quatro (4,4%) foram positivos ao teste do IDGA, e destes, três (75,0%) foram positivos ao IDGA/2-ME, enquanto que uma (25,0%) amostra foi negativa. A análise de concordância entre os testes utilizados nesse estudo encontra-se na Tabela 1. Nenhum animal foi reagente ao teste do AAT para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus*.

Tabela 1: Análise de concordância entre as provas Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e Imunodifusão em Gel de Agarose tratadas com 2-Mercaptoetanol (IDGA/2ME) em cães atendidos em clínicas particulares na cidade de Maceió, Alagoas

IDGA	IDGA/2-ME		Total	Valor <i>Kappa</i>
	Positivo	Negativo		
Positivo	03	01	04	0,851
Negativo	-	86	86	
Total	03	87	90	

De acordo com revisão realizada por Almeida et al. (2004) os índices de prevalência de animais sororreagentes para *Brucella abortus* são baixos. A não-presença de infecção pela *B. abortus* nesse estudo pode ser justificada uma vez que não possuíam contato com animais de produção.

Os resultados da freqüência de animais sororreagentes observados neste estudo para aglutininas anti-*Brucella canis* foram superiores aos descritos em Belo Horizonte, 1,3% (Godoy et al., 1977) e na Microrregião da Serra de Botucatu, 1,77% (Moraes et al., 2002). Porém, foram inferiores aos relatados em São Paulo 9,1% em cães de canil e 7,5% em cães errantes (Larson et al., 1981), 7,5% (Cortes et al., 1988); 9,51% em Santana de Parnaíba (Azevedo, 2002); em Porto

Alegre, 11,97% (Wald e Fernandes, 1976/1977); no Rio de Janeiro e em Niterói, 29,4% e 19,2%, respectivamente (Maia et al., 1999); em Uruguaiana, 72,7% (Vargas et al., 1996) e Recife, 16,6% (Numeriano et al., 1999).

As variações encontradas podem ser explicadas provavelmente devido à utilização de métodos sorológicos diferentes que apresentam sensibilidade e especificidade diferentes (Nicoletti e Chase, 1988) e ao tipo de amostra estudada, bem como pela presença de animais no início de infecção, onde os anticorpos podem ainda não ser detectados no IDGA (Carmichael e Greene, 1993).

Comparando-se os resultados nas provas utilizadas, observou-se uma diferença na frequência de animais sororreagentes. Resultados inferiores foram relatados por Keid (2001), 44,8% (IDGA) e 6,25% (IDGA/2-ME) e Azevedo (2002) que encontrou 48,75% (IDGA) e 18,75% (IDGA/2-ME). Essas diferenças observadas podem ser justificadas pela ocorrência de reações inespecíficas quando da utilização da IDGA, pois os antígenos da parede celular (LPS) de algumas bactérias Gram-negativas apresentam reação cruzada com a *Brucella canis* (Johnson e Walker, 1992; Carmichael e Greene, 1993). Podem ocorrer também porque alguns animais sororreagentes na IDGA poderiam estar na fase aguda da doença onde são produzidos anticorpos da classe IgM (Carmichael e Kenney, 1970) que são desnaturadas pelo 2-ME, portanto, o teste IDGA + 2-ME detecta apenas animais na fase crônica da doença. Outra possibilidade seria a desnaturação das IgM procedentes de reações inespecíficas (Greene e George, 1984; Johnson e Walker, 1992; Carmichael e Shin, 1996), reduzindo também o número de animais reagentes quando se utiliza o 2-ME.

Os principais distúrbios reprodutivos encontrados neste estudo foram: infertilidade (60,0%) e perda da libido (40,0%) nos machos; aborto (33,3%), número reduzido de filhotes (23,8%), infertilidade (19,1%), nascimento de filhotes debilitados que vieram a óbito na primeira semana de vida (14,3%), natimortos e corrimento vaginal (9,5%), má-formação fetal, pseudociese e piometra (4,8%), nas fêmeas. Quando se analisaram os animais que apresentavam ou não sinais clínicos sugestivos da brucelose canina, observou-se que 6,5% destes mostraram-se positivos à prova de IDGA, enquanto nos animais que não apresentavam sintomas, apenas 3,4% foram considerados positivos.

Quando se aplicou o teste estatístico, a associação entre distúrbios reprodutivos e reação positiva ao teste IDGA mostrou-se presente apenas nos machos que apresentavam sinais clínicos ($p < 0,05$). Numa simulação, onde o número de animais foi duplicado, mantendo-se as mesmas características da amostra estudada, observou-se que os animais com sinais clínicos apresentavam uma taxa de positividade aproximadamente quatro vezes maior que os animais clinicamente saudáveis, confirmando a associação de histórico

de infertilidade e distúrbios reprodutivos com anticorpos anti-*Brucella canis* nos machos. Nas fêmeas, essa associação não foi observada, talvez por não ser a *Brucella canis* o principal microrganismo envolvido nos distúrbios reprodutivos nesses animais, já que outros agentes infecciosos e parasitários podem causar abortos, infertilidade, entre outras patologias do sistema reprodutor (Carmichael e Greene, 1993).

Ao se analisar as variáveis faixa etária, sexo e raça observou-se que apenas a raça apresentou associação significativa com a soropositividade para infecção por *B. canis* (Tabela 2). Pesquisas realizadas por Azevedo et al. (2003); Cavalcanti et al. (2006) não demonstraram associação significativa entre a variável raça e soropositividade para *B. canis*.

Não se observou associação significativa entre infecção e faixa etária dos animais estudados. De acordo com revisão realizada por Azevedo et al. (2003) a maturidade sexual e conseqüente cobertura, bem como maior possibilidade de contato entre animais infectados pode ajudar a disseminação da doença. Entretanto, animais impúberes podem adquirir a infecção, onde normalmente a manifestação clínica é apenas uma linfadenopatia uni ou bilateral. No entanto, os sinais clínicos reprodutivos só se manifestam após a puberdade.

Tabela 2: Associação entre a infecção pela *Brucella canis* utilizando IDGA/2-ME e variáveis faixa etária, sexo e raça em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió, Alagoas

Variáveis	Descrição	Positivo	Negativo	OR (IC 95%)	Valor de p
Faixa etária	1 a 2 anos	-	22	0,00 (0,00 a 7,58)	0,426
	Acima de 2 anos	3	65		
Total		3	87		
Sexo	Macho	1	27	1,11 (0,02 a 22,18)	0,678
	Fêmea	2	60		
Total		3	87		
Raça	Com raça definida	1	80	0,04 (0,00 a 1,01)	0,025*
	Sem raça definida	2	7		
Total		3	87		

OR – odds ratio; *Associação significativa a 5%

Nesse estudo o sexo não apresentou diferença significativa concordando com os resultados obtidos por Cavalcanti et al. (2006). De acordo com esses autores não há predisposição quanto ao sexo, estando machos e fêmeas expostos de uma forma semelhante ao risco de infecção.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a infecção por *Brucella canis* ocorre na cidade de Maceió, AL e que medidas de controle e profilaxia devem ser empregadas para evitar a disseminação do agente para criatórios livres da doença.

Referências

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1989. 503 p.
- ALMEIDA, A.C. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.
- ALTON, G.G. et al. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190 p.
- AZEVEDO, S.S. et al. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 4, p. 156-160, 2003.
- AZEVEDO, S.S. *Brucelose por Brucella canis em cães do Município de Santana de Parnaíba – SP, Brasil. Inquérito sorológico, fatores de risco e comparação de testes diagnósticos*. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BERTHELOT, X.; BASTUJI, B.G. A brucelose do cão. *A Hora Veterinária*, n. 92, p. 47-50, 1996.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 152, p. 605-616, 1968.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 156, n. 12, p. 1726-1734, 1970.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Brucellosis canina. In: CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. *Enfermedades Infecciosas Perros y Gatos*. México, Interamericana: McGraw – Hill, 1993. p. 604-615.
- CAVALCANTI, L.A. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.
- CORTES, V.A et al. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade de parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.
- DEAN, A.G. et al. *Epi Info, Version 6.01: A Word Processing, Database and Statistics Program for epidemiology on Microcomputers*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstia do cão e do gato*. São Paulo: Manole, 1997. 2256 p.
- GODOY, A.M. et al. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 29, n. 1, p. 35-42, 1977.
- GOMES, M.J.P. et al. *Brucella canis*: Isolamento em um cão com epididimite e orquite – relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 18, p. 17-20, 1999.
- GREENE, C.E.; GEORGE, L.W. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of Dog and Cat*. Philadelphia: 1984. p. 646-662.
- JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Small Animal*, v. 14, n. 6, p. 763-772, 1992.
- 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 reação em cadeia de polimerase*. 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LARSSON, M.H.M.A. et al. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. *International Journal Zoonoses*, v. 8, p. 85-90, 1981.
- MAIA, G.R. et al. Prevalência da brucelose canina nas Cidades do Rio de Janeiro e Niterói – RJ. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 425-427, 1999.
- MINHARRO, S. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 3/4, p.167-173, 2005.
- MORAES, C.C.G. et al. Prevalência da brucelose canina na Microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992. 737 p.
- NICOLETTI, P.; CHASE, A. Avaliação dos métodos de diagnóstico da infecção por *Brucella canis* em cães. *Cães e Gatos*, p. 21-23, 1988.
- NUMERIANO, A.K.M. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Brucella canis* em cães errantes e domiciliados do Município de Recife – PE. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE, 10., Recife, PE. *Anais...* Recife: 1999. p. 215-216.
- SOUZA, L.A. et al. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte – MG. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*; v. 24, n. 3, 2002.
- TRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. London: Butterworth, 1986, 273 p.
- VARGAS, A.C. et al. Brucelose canina: relato de um caso. *Ciência Rural*, v. 26, n. 12, p. 305-308, 1996.
- WALD, V.B.; FERNANDES, J.C.T. Sorologia da brucelose canina no Município de Porto Alegre, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul*, v. 4/5, p. 92-95, 1976/1977.