

PERFIL SOROLÓGICO, ISOLAMENTO BACTERIANO E VALORES HEMATOLÓGICOS E URINÁRIOS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Brucella canis*

SEROLOGY, BACTERIAL ISOLATION, HEMATOLOGICAL AND URINARY VALUES IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Brucella canis*

Jane Megid¹ Carla Cristina Guimarães de Moraes²
Gilberto Marcos Junior² Jorge Vitor Bacila Agottani³

RESUMO

Descrevem-se os parâmetros hematológicos, urinários, perfil sorológico de aglutininas antibrucélicas e resultados de isolamento bacteriano de swab vaginal, líquido prostático e hemocultura de 12 cães naturalmente infectados por *Brucella canis*. Observaram-se flutuação dos resultados sorológicos, ausência de isolamento de *B. canis* nos diversos materiais colhidos e valores hematológicos e urinários predominantemente normais. Discute-se o diagnóstico de brucelose canina em nível individual.

Palavras chave: brucelose, cães.

SUMMARY

This work describes the serology, bacterial isolation of vaginal swabs and hemoculture and hematological and urinary values of twelve dogs naturally infected with *Brucella canis*. Fluctuation of positive results in the serology, absence of isolation of *B. canis* in the hemoculture and vaginal swabs, and normality of haematological and urinary parameters were observed in the infected animals.

Key words: brucellosis, dog.

INTRODUÇÃO

A brucelose canina causada pela *B. canis* é uma enfermidade infecto-contagiosa, de caráter zoonótico, caracterizada, principalmente, por abortos e esterilidade nas fêmeas e orquite e epididimite nos

machos. Foi descrita, inicialmente, nos Estados Unidos em 1966 e, a partir daí identificada em todo o mundo (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI, 1993), inclusive no Brasil (SCHLEMPER & VAZ, 1990; GERMANO *et al.*, 1987; NETO *et al.*, 1992; VARGAS *et al.*, 1996). Apesar do seu caráter sistêmico, os valores sanguíneos, bioquímicos e urinários normalmente não apresentam alterações (JOHNSON & WALKER, 1992), impossibilitando a utilização desses dados quando da suspeita clínica. Dessa forma, o diagnóstico da enfermidade baseia-se no isolamento do agente através de hemocultura e cultivo de material abortado, secreções vaginais e uterinas, urina, sêmen e líquido prostático. Também pode ser realizado através da sorologia dos animais, sendo esse método o mais utilizado em função da dificuldade de realização do isolamento bacteriano (JOHNSON & WALKER, 1992). Pretendeu-se, no presente trabalho, avaliar os resultados obtidos em exames bacteriológicos, valores hematológicos e urinários e perfil sorológico apresentados por cães naturalmente infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram acompanhados, através de sorologia, hemocultura e cultivo de material genital ou urina, 12 cães da raça poodle (02 machos e 10 fêmeas), com idade variável entre 6 meses e 7 anos, natu-

¹Professor Assistente, Doutor do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu, SP, CP 560, 18618-000. Botucatu-SP. Email- megid@laser.com.br. Autor para correspondência.

²Pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Botucatu.

³Médico Veterinário do Instituto Tecnológico do Paraná, TECPAR.

ralmente infectados com *Brucella canis*, pertencentes a um mesmo canil. Este estabelecimento caracterizava-se por vendas constantes de coberturas de seus machos e cobertura de suas fêmeas por diferentes machos, aliado à ausência de medidas profiláticas direcionadas contra brucelose. Das 10 fêmeas sorologicamente positivas, 7 tinham histórico de repetição de abortos, partos prematuros, nascimento de filhotes fracos e morte perinatal. Os machos apresentavam, como histórico, ocorrência de abortos decorrente de suas coberturas e positividade sorológica em fêmeas por eles cobertos. Os animais foram mantidos em isolamento, no setor de Enfermidades Infeciosas dos Animais-FMVZ-UNESP-Botucatu e submetidos a colheitas de sangue periódicas, através de punção jugular, por um período de 9 meses. Os soros obtidos foram submetidos à prova de imunodifusão em ágar-gel, utilizando como antígeno *B. ovis*, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, de acordo com a metodologia preconizada pelo laboratório produtor. O teste foi realizado utilizando-se dois soros reagentes em lados opostos da roseta e avaliando-se as reações de identidade através da confluência de linhas dos soros testados frente aos soros positivos. A leitura foi realizada em períodos de 24h, 48h e 72h.

Paralelamente, os soros obtidos foram tratados com 2-mercaptoetanol (2-ME), utilizando-se 0,1 ml de soro, adicionado de 0,1ml, de uma solução 0,1M, de 2-ME. Após um período de, no mínimo, 30 minutos, o soro assim tratado foi submetido ao teste de imunodifusão em ágar-gel, para avaliação da especificidade da reação (GEORGE & CARMICHAEL, 1974), avaliando-se de forma semelhante a identidade de reação frente aos soros positivos.

Inicialmente, procedeu-se a colheita de sangue heparinizado para hemograma e hemocultura; não heparinizado para obtenção de soro; e obtenção de urina para urinálise, realizada através de cistocentese das fêmeas e sonda vesical dos machos. Posteriormente, foram realizadas outras 7 colheitas, com intervalo de 3 dias cada, de sangue heparinizado para hemocultura, material vaginal das fêmeas, obtido através de swabs estéreis, e urina ou líquido prostático ou espermático dos machos, colhido por estimulação manual. Após o tratamento, realizou-se em todas as fêmeas, ovariectomia. O material obtido, em todos os momentos, incluindo o útero e ovário obtido após a ovariectomia, foi semeado em ágar-sangue, ágar-brucella adicionado de 5% de sangue e ágar Mac Conkey, mantidos em estufa a 37°C, durante 7 dias, e submetidos à identificação bacteriana através de características tintoriais, morfológicas e bioquímicas (CARTER &

CHENGAPPA, 1988). Para a hemocultura, adicionalmente, o sangue foi semeado em BHI, congelado uma noite a -20°C, descongelado e mantido em estufa a 37°C por 7 dias (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI, 1993). Os valores hematológicos e urinários foram obtidos uma única vez, respectivamente, através de colheita sangüínea por punção jugular, utilizando heparina como anticoagulante e urinária através de cistocentese, sendo encaminhados, imediatamente após, para análise no Laboratório de Análises Clínicas da FMVZ-UNESP, Botucatu.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período do experimento, os animais foram observados diariamente, não se verificando quaisquer alterações clínicas evidentes.

Verificou-se, nos materiais procedentes de swab vaginal, variação de flora com predominância de *Staphylococcus sp.* coagulase positivo, seguida por *Streptococcus sp.* e *Corynebacterium sp.* Observou-se o isolamento em menor proporção de *E.coli* e *Alcaligenes faecalis* (Tabela 1). Os agentes bacterianos isolados da vagina das fêmeas são agentes considerados flora normal. A variação observada pode ser justificada em função do ciclo estral dos animais (BARSANTI & JOHNSON, 1990).

A hemocultura resultou negativa em todos os períodos avaliados. Não se obteve isolamento de *B.canis* nos diversos materiais e períodos analisados. O não isolamento de *B. canis* em secreções vaginais, prostáticas, urina e sangue pode ser justificado pela ausência de bacteremia nos animais, o que poderia ser um indicativo de infecção crônica nos animais adultos. Nos animais jovens impúberes a *B. canis* não é isolada frequentemente de secreções vaginais em função da seletividade do agente pela maturidade sexual (JOHNSON & WALKER, 1992). Pode ser justificada adicionalmente pela necessidade de utilização de meios de cultura seletivos adicionados de antibióticos para redução de flora contaminante, o que facilitaria o isolamento de *B. canis* (CARMICHAEL, 1990).

Verificou-se na sorologia, em todos os animais, flutuação de resultados positivos e negativos no período de tempo avaliado (Tabela 2). A presença de resultados positivos e negativos nos animais foi verificada neste trabalho e relatada por JOHNSON & WALKER (1992), sendo justificada pela bacteremia intermitente, levando a desaparecimento ou diminuição de títulos sorológicos, porém com persistência do agente nos tecidos infectados (JOHNSON & WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1976).

Tabela 1 - Bactérias isoladas a partir de swab vaginal de fêmeas naturalmente infectadas com *B. canis*, 1997.

Data	21/11	25/11	28/11	3/12	5/12	9/12	12/12	15/12
01*	ST.+	ST.+/ STr	ST.-/ STr	ST.+/ Cor/ E.co	ST.-/ STr/ Cor.	ST.-	ST.-	ST.-/ STr Cor
02	ST.+/ Cor	STr/ E.co	ST.-/ Cor	Cor	STr	ST.+/ ST.-	STr	STr/ ST.-
04	ST.+	ST.+	ST.+	ST.+/ ST.-	ST.-	ST.+	ST.-	ST.+
05	neg	ST.+/ Cor	STr	ST.-/ E.co	STr	ST.+	ST.-	neg
06	neg	neg	ST.-/ E.co/ A.faec	ST.-/ STr	ST.+/ ST.-	ST.-	ST.-	ST.+
08	ST.+/ Cor.	ST.+/ Cor.	ST.+/ STr	ST.-/ STr	ST.-/ STr	STr	ST.+/ STr	STr/ Cor.
09	neg	ST.+	ST.+	ST.-/ Cor	ST.-	ST.+	ST.+/ STr	ST.+/ ST.-/ Cor
10	Cor	ST.+/ Cor	ST.+/ ST.-	ST.-	ST.-	ST.+/STr	ST.+	ST.+/ ST.-
11	ST.+	ST.+	ST.+	ST.-/ Cor	ST.-	ST.+/ ST.- Cor	ST.+	ST.-
12	ST.+	ST.+	ST.+	ST.-	ST.-	ST.+	contam	ST.+

* Número do cão

ST +.= *Staphylococcus* coagulase positivo

Cor = *Corynebacterium* sp

ST -.= *Staphylococcus* coagulase negativo

STr = *Streptococcus* sp

E.co = *Escherichia coli*

A.faec = *Alcaligenes faecalis*

neg = ausência de crescimento bacteriano

contam = contaminação

A imunodifusão em ágar-gel, mesmo utilizando como antígeno *B. ovis*, é considerada uma prova mais específica que a prova de soroaglutinação rápida utilizando 2-mercaptoetanol (JOHNSON & WALKER, 1992), porém ainda sujeita a resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com outros agentes (CARMICHAEL, 1976) como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* sp (JOHNSON & WALKER, 1992). Isso dificulta o diagnóstico individual, porém o mesmo não ocorre em cães pela presença da enfermidade em vários animais, associado ao histórico dos mesmos (CARMICHAEL, 1976).

Resultados positivos em soros não tratados com 2-ME e negativos, quando tratados com 2-

ME, podem ser observado na tabela 2 e justificados pela redução das aglutininas inespecíficas, em função do tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol, com conseqüente diminuição do título sorológico em 2 vezes (CARMICHAEL, 1976). A redução do título, bem como a diluição prévia dos soros, poderia levar à negatividade verificada em alguns casos, em função da prova de imunodifusão em ágar-gel não apresentar alta sensibilidade e sim alta especificidade (JOHNSON & WALKER, 1992).

Os valores hematológicos apresentados pelos animais situaram-se, em sua maioria, na faixa de normalidade, tendo sido verificados em somente 2 fêmeas uma leve leucocitose e, em 5 animais, monocitose em grau variável (Tabela 3), alterações

Tabela 2 - Resultados da prova de imunodifusão em ágar-gel, em soros de cães naturalmente infectados com *B. canis*, submetidos ou não ao tratamento com 2-ME (sem 2-ME/com 2-ME), 1997.

	19/ 8* ¹	25/ 11*	5/12 *	12/ 12*	22/ 12*	13/1 **	22/4 **	6/5 **	16/5 **	23/ 5**	28/5 **	5/6 **	11/6 **	18/6 **	4/7 **	14/8 **	30/9 **	23/ 10**	17/ 11**	13/ 12* *	
01	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+?	+/-	+/-	+/-	f+/-	-/-	-/-	f+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
02	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+?	+/+?	+/-	+/-	+/-	f+/-	f+/-	-/-	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
03♂	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	f+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	f+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
04	+/+	+/+	nt	+/+	+/+	+/+	+/+	f+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
05	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	f+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	nt
06	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	f+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
07♂	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
08	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
09	+/+	+/+	nt	+/+	+/+	+/+	f+/-	+/-	+/-	f+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	f+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
11	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nt
12	+/+	+/+	nt	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

♂ machos ¹data do diagnóstico no canil *1996 **1997

Tabela 3 - Valores hematológicos apresentados por cães naturalmente infectados com *B. canis*, 1997.

Animal	Hemácias	Leucócitos	neutrófilos*	Linfócitos*	eosinófilos*	monócitos*
01	6720.000	8.137	54	37	03	06
02	7010.000	7.612	49	41	08	02
03♣	6050.000	12.180	62	25	02	06
04	6080.000	13.282	61	33	05	01
05	6930.000	6.775	68	25	05	02
06	5780.000	17.905	67	18	05	10
07♣	6110.000	10.500	38	43	03	15
08	6880.000	14.805	41	47	03	09
09	6150.000	19.425	56	26	05	13
10	6780.000	10.185	68	22	02	08
11	7170.000	9.922	58	19	00	23
12	7280.000	10.552	49	35	01	15

* valores expressos em percentual

♣ machos

que podem ser justificadas pela liberação de corticosteróides endógenos decorrentes de “stress” (MEYER *et al.*, 1989). De forma semelhante, não se observaram alterações significativas, decorrentes da enfermidade, nos parâmetros urinários apresentados pelos animais (Tabela 4), aspecto concordante com CARMICHAEL & GREENE (1990). Os parâmetros urinários alterados em alguns animais não apresentam correlação com a enfermidade.

Tentativas terapêuticas em brucelose canina são questionáveis em função da localização intracelular da bactéria. Em função disso, considera-se que animais infectados devem ser eliminados de programas de cobertura e submetidos à antibioticoterapia (CARMICHAEL, 1990), conduta realizada com os animais deste experimento, reduzindo, dessa forma, a possibilidade de transmissão ao ser humano.

O presente trabalho chama a atenção para a flutuação de resultados sorológicos verificados em

animais naturalmente infectados com *B. Canis*, podendo levar a resultados falso-negativos em casos individuais, bem como à dificuldade de isolamento da *B. canis*, nesses animais, tanto em hemocultura como em secreções vaginais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARSANTI, J.A., JOHNSON, C.A. Genitourinary infections. In: GREENE, C.E. **Infections diseases of the dog and cat**. Philadelphia : Saunders, 1990. p.157-158.
- BERTHELOT, X., GARIN-BASTUJI, B. Bruceloses canines. **Le Point Veterinaire**, v.25, p.33-37, 1993.
- CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, New York, v.6, p.105-116, 1976.
- CARMICHAEL, L.E. **Animal brucellosis**. Boca Raton., USA . CRC, 1990. *Brucella canis*: p.335-350.

Tabela 4 - Parâmetros urinários apresentados por cães naturalmente infectados com *B. canis*. 1997.

Animal	Den-sidade	Protei-na	glicose	acetona	sais biliares	Bilir rubina	uro bilinogênio	pH	celulas	hemácias	Leucó-citos	cilindros	bactéri as
01	1040	-	-	-	-	-	n	7,5	raras	2-3	0-7	-	+
02	1036	traço	-	-	-	-	n	8,0	-	-	-	-	-
03♣	1040	traço	-	-	-	-	n	5,0	raras	raras	Raras	+	+
04	1040	traço	-	-	-	-	n	8,0	-	-	Raras	-	++
05	1032	traço	-	-	-	-	n	8,0	-	0-1	2-3	-	++
06	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
07♣	1040	++	-	-	+	+	alter.	8,0	+ves	30-35	6-7	-	++
08	1040	traço	-	-	-	-	n	8,0	-	-	0-1	-	++
09	1040	+	-	-	-	-	n	9,0	-	-	-	-	-
10	1040	traço	-	-	-	-	n	7,5	-	15-20	Raros	-	+
11	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
12	1040	-	-	-	-	-	n	8,0	-	25-30	Raros	-	-

♣ machos NT = não testado alter = alterado

- CARMICHAEL, L.E., GREENE, C.E. Canine brucellosis In: GREENE,C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia : Saunders, 1990. p 573-584.
- CARTER, R.G., CHENGAPPA, M.M. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. 3.ed. São Paulo : Roca, 1988. 284p.
- GEORGE, L.W., CARMICHAEL,L.E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.35, p.905-909, 1974.
- GERMANO, P.M.L., VASCONCELLOS, S.A., ISHIZUKA, M.M. *et al*. Prevalência da infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.24, p.27-34, 1987.
- 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**, New Jersey, v.14, n.6, p.763-772, 1992.
- MEYER, D.J., COLES, E.H., RICH, L.J. **Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis**. Philadelphia : Saunders, 1989. 350p.
- NETO, M.N., DAURESE, F.W., SANTOS, A.F. *et al*. Prevalência de humanos e caninos reatores à *Brucella rugosa* no município de Pelotas, RS. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11, 1992, Gramado, RS. **Anais...** Gramado : Sociedade de Veterinária do RS, 1992. p. 92.
- SCHLEMPER, S.R., VAZ, A.K. Inquérito sorológico para *Brucella canis* na região do planalto catarinense, Brasil. **Revista Brasileira de Veterinária**, v.12, p.8-12, 1990.
- VARGAS, A.C., LAZZARI,A., DUTRA, V. *et al*. Brucelose canina: relato de caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, p.306-308, 1996.