

# INVESTIGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *Brucella abortus* EM MAMÍFEROS SILVESTRES *Leopardus geoffroyi* e *Cerdocyon thous*

JORGE, S.<sup>1\*</sup>; RECUERO, A. L. C.<sup>1</sup>; ALBANO, A. P. N.<sup>2</sup>; COIMBRA, M. A. A.<sup>2</sup>; MINELLO, L. F.<sup>2</sup>; FERNANDES, C. P. H.<sup>1</sup>; BROD, C. S.<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa de evolução preferencialmente crônica provocada por bactérias do gênero *Brucella*, é uma antropozoonose de caráter ocupacional, de forma que tratadores e veterinários ao manipular restos placentários, fetos abortados e carcaças provenientes de animais infectados, expõem-se ao risco de infecção. O risco em saúde pública se dá principalmente quando ocorre ingestão de leite ou derivados, oriundos de animais infectados, que não sofreram tratamento térmico, portanto, a ocorrência da doença em humanos é dependente da brucelose em reservatórios animais, incluindo espécies silvestres [1,5,7,8]. A brucelose possui distribuição cosmopolita e mesmo o agente não sendo capaz de esporular apresenta grande resistência no ambiente comparada com outras bactérias patogênicas e é caracterizada patologicamente pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário [7]. As vias de penetração são as mucosas do trato digestivo, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele [1,7].

As brucelas são intracelulares facultativas e podem ser divididas em dois grupos com morfologia de colônias distintos: as lisas - *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, e as rugosas - *B. ovis* e *B. canis*. Não há especificidade quanto ao hospedeiro que infectam, mas existe uma predileção por determinada espécie animal. Assim, a *B. abortus* acomete preferencialmente bovinos e bubalinos, a *B. suis* suínos, a *B. melitensis* caprinos, a *B. ovis* ovinos, *B. canis* canídeos e *B. neotomae* rato-do-deserto (*Neotoma lepida*) [7]. Em alguns países tem sido isolado, a partir diversos mamíferos marinhos, um grupo de brucelas distinto das espécies conhecidas denominadas provisoriamente como *B. maris* e posteriormente, devido às análises moleculares, sugeriu-se ainda sua subdivisão em *B. pinnipediae* e *B. cetacea* [2,3].

Os felídeos silvestres não são considerados como potenciais fontes de infecção e diversas espécies de canídeos pode ter sorologia positiva, pois se considera que estes podem se alimentar de restos placentários ou fetos abortados de rebanhos bovinos infectados [4,6].

Várias outras espécies silvestres são suscetíveis à infecção por *B. abortus*, entretanto são consideradas hospedeiras finais da infecção, pois se considera que não transmitem o agente aos bovinos [4]. As principais manifestações nos animais são abortos, nascimentos prematuros e esterilidade, pois os órgãos de predileção são testículos e útero gravídico que possuem eritritol, um álcool polihídrico necessário ao seu metabolismo [1,7].

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária – Centro de Controle de Zoonoses – UFPel – (53) 3275-7424

<sup>2</sup>Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre – NURFS/CETAS -UFPel – (53) 3275-7227

Com o intuito de realizar diagnóstico e um estudo preliminar de reservatórios silvestres, amostras sorológicas de quatro espécimes de carnívoros silvestres – 2 gatos-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) e 2 graxains-do-campo (*Cerdocyon thous*) - atendidas no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre/Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas, foram submetidas ao teste de triagem e confirmatórios para *Brucella abortus*, cujos resultados estão descritos neste presente trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais Silvestres

Espécimes de carnívoros silvestres da região sul do Rio Grande do Sul, atendidos no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre/Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas, foram submetidos as contenções física e química para avaliação clínica e coleta de amostras de sangue total para realização de hemograma completo e diagnóstico sorológico.

### Amostras de soros

Foram utilizadas amostras de soro de 2 gatos-do-mato-grande e 2 graxains-do-campo contra o antígeno *Brucella abortus*. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3.000 rpm e o soro sobrenadante estocado a -20 °C. O diagnóstico sorológico para ambos os testes foi realizado na Faculdade de Veterinária – Centro de Controle Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

### Teste do antígeno acidificado tamponado para diagnóstico de brucelose (AAT)

Para a realização do teste as amostras de soro previamente coletadas foram retiradas do estoque, descongeladas a temperatura de 20 °C, homogeneizadas e de cada amostra utilizado 30 µL de soro para reação com 30 µL de antígeno para AAT, constituído de suspensão do antígeno de *B. abortus* amostra 1119-3. O homogeneizado de soro em teste e antígeno foi agitado a 30 rpm durante 4 min. O mesmo volume de soro e antígenos foram utilizados para os soros controle negativo e positivo incluídos no teste. A leitura foi realizada em caixa de luz com fundo escuro e foi considerado positivo o soro capaz de aglutinar o antígeno.

### Teste de aglutinação lenta em tubos (SAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME)

Para a realização do teste as amostras de soro previamente coletadas foram retiradas do estoque e descongeladas a temperatura de 20 °C e diluídas em soluções de antígeno de *B. abortus* amostra 1119-3 na concentração de 0,045 % nas diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 para o SAT. Paralelamente as mesmas diluições do SAT foram realizadas em 0,1M de 2-ME e após 30 min adicionadas de uma suspensão de antígeno *B. abortus* amostra 1119-3 na concentração de 0,09 %. Soros controles, negativo e positivo, com títulos alto, médio e baixo foram incluídos para controle do teste. As amostras foram

incubadas a 37 °C por 48 h e a leitura realizada utilizando luz indireta. Considerou-se resultado positivo para o teste do SAT e 2-ME, todo o soro com capacidade aglutinante a partir da diluição de 1:25. As interpretações basearam-se na firmeza dos grumos e no grau de aglutinação após suave agitação dos tubos, sendo que os resultados possíveis são: aglutinação completa, incompleta ou negativa e os resultados finais foram obtidos utilizando uma tabela padrão de interpretação.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

No teste de triagem (AAT), obtiveram-se resultados distintos para as diferentes famílias. Para os dois canídeos silvestres (graxains-do-campo) não houve aglutinação em nenhuma amostra, indicando ausência de anticorpos nos soros testados. Para os dois felinos silvestres testados, uma amostra foi reagente e outra não reagente. Seguindo o protocolo recomendado pelo PNCEBT para o diagnóstico de certeza de *B. abortus*, realizou-se o teste confirmatório do 2-ME para o gato-do-mato-grande cujo teste sorológico obteve resultado positivo no teste de triagem. Para uma investigação mais completa, optou-se testar na prova do 2-ME também nas amostras negativas no AAT. As reações negativas no teste AAT para as amostras dos dois graxains-do-campo foram interpretadas como suficientes para fins de diagnóstico e vigilância epidemiológica [5].

Ambas as amostras dos gatos-do-mato-grande não reagiram em todas as diluições, tanto na prova lenta como na prova do 2-ME indicando ausência de IgG e IgM.

Analisando-se os resultados obtidos nos testes de triagem e confirmatórios, um dos gatos-do-mato-grande com resultado positivo no AAT quando testado na prova confirmatória do 2-ME, obteve resultado negativo. Considerando o teste do 2-ME de alta sensibilidade, interpretou-se que o soro desse animal reagiu negativamente quando enfrentado contra o antígeno *B. abortus*.

Reações falso-positivas no teste do AAT são possíveis e este fato foi considerado no caso da amostra do gato-do-mato-grande, pois pode ocorrer a presença de imunoglobulinas não específicas presente em infecções por diversas bactérias tais como: *Pseudomonas* spp., *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* spp ou *Escherichia coli* O:157 [7].

## CONCLUSÃO

Comparando-se os resultados nos testes de triagem e confirmatórios, conclui-se que o teste do AAT apresenta alta sensibilidade e moderada especificidade, pois se deve considerar a possibilidade de um resultado falso positivo.

Recomenda-se a prova do AAT para diagnóstico e para a investigação epidemiológica de reservatórios silvestres, os resultados negativos nesta prova podem ser interpretados como suficientes, porém caso os resultados sejam positivos, as amostras devem ser testadas na prova do 2-ME, que oferece um diagnóstico de certeza.

Sugere-se, portanto, que os soros de carnívoros silvestres que forem enfrentados com o antígeno *B. abortus* sejam submetidos ao protocolo diagnóstico estabelecido pelo PNCEBT e realizados em laboratórios credenciados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v.1.
- [2] BRICKER, B.J.; ET AL; Molecular Characterization of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals: *Journal of Clinical Microbiology*, 3,. 2000, 1258–1262
- [3] CLOECKAERT, A; ET AL. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus, *Microbes and Infection*, 3, 2001, 729-738.
- [4] FIORELLO, C. V. ; et AL. Serosurvey of Small Carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3), 2007, pp. 551–557.
- [5] GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2002, 21 (2), 277-286.
- [6] MELODY, E. Roelke, M. E.; et al.; Seroprevalence of infectious disease agents in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor cory*) *Journal of Wildlife Diseases*, 29( 1 ). 1993, pp .156-49.
- [7] PAULIN, L.M. Brucelose, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n2, p.239-249, abr./jun., 2003.
- [8] TESSARO, S. V. The Existing and Potential Importance of Brucellosis and Tuberculosis in Canadian Wildlife: A Review. *Can Vet J* 1986; 27: 119-124.