

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Levantamento epidemiológico da brucelose canina no município de
Patos, Paraíba**

Annielle Regina da Fonseca Fernandes

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Levantamento epidemiológico da brucelose canina no município de
Patos, Paraíba**

Annielle Regina da Fonseca Fernandes
Graduanda

Sérgio Santos de Azevedo
Orientador

Marcia Almeida de Melo
Co-orientadora

Patos
Setembro de 2009

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

F3631

2009

Fernandes, Annielle Regina da Fonseca.

Levantamento epidemiológico da brucelose canina no município de Patos, Paraíba / Annielle Regina da Fonseca Fernandes. – Patos – PB: CSTR/UFCG, 2009.

71p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador(a): Sérgio Santos de Azevedo.

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

Título 1 – Brucelose canina - Levantamento epidemiológico - Monografia. I –

CDU: 616-036.22:636.7

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANNIELLE REGINA DA FONSECA FERNANDES
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADO EM: 01/10/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Prof^a. Dr^a. Marcia Almeida de Melo

Prof. Dr. Edisio Oliveira Azevedo

*Dedico este trabalho e todas
as outras vitórias da minha
vida aos meus eternos
amores, que me ensinaram
o exemplo de verdadeira
família: Hélia e Ademir.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS pelo simples milagre de acordar todos os dias, mas, sobretudo com forças para continuar essa caminhada.

À minha mãe Hélia Regina, pelo seu imenso amor, e por ser um exemplo de mulher admirável pela sua força e compaixão. Muito obrigada por ser você, te amo.

Ao meu pai Ademir Gomes, homem trabalhador, de caráter íntegro e verdadeiro exemplo de homem, marido e pai. Muito obrigada por tudo, te amo pai.

Ao meu namorado Vinicius Araújo por todo carinho e compreensão, mas acima de tudo por me ensinar a ser cada vez mais forte.

Aos meus avós paternos Francisca (*in memorian*) e Antônio, como também aos maternos Lenira (*in memorian*) e Pedro pelos exemplos de força e perseverança.

À minha Titia Elma, minha segunda mãe e irmã mais velha, por todo o cuidado e carinho a mim dados, muito obrigada.

À minha tia e agora companheira de profissão Ademilde Gomes pelos ótimos momentos de alegria, carinho, atenção e dedicação além dos exemplos de coragem e profissionalismo, à você meu muito obrigada.

Ao meu priminho Arthur pelo carinho e por encher meu coração de alegria.

Ao meu orientador, Prof. Sérgio Santos Azevedo pelas oportunidades, confiança e crédito a mim dados.

À minha co-orientadora, Prof^a. Márcia Melo, por toda a paciência, ajuda prestada, companheirismo e dedicação, bem como à sua família: Paulo Paes, Camila e Lucas, pelo carinho e bons momentos de descontração.

Às minhas amigas de morada Sâmia Felizardo e agora Aline Antas pela oportunidade de conhecê-las, pela amizade conquistada, pelas lágrimas e risadas compartilhadas.

Aos meus eternos amigos de Brejo do Cruz – PB, Juliana, Isabel e Vitor que sempre torceram por mim, pelos ótimos momentos juntos, por nunca deixarem nossa amizade se perder com a distância.

Aos meus amigos Sônia Felizardo (Tia Sônia) e Ismael Vital, por todo carinho e prestatividade, muito obrigada.

À todos os meus professores que muito contribuíram para minha formação tanto profissional como pessoal, mas especialmente a Gildenor Xavier, Danilo, Fernando Zanella, Fernando Borja, Solange Absalão, Francisco de Assis, Olaf Bakke, Bonifácio, Rosângela, Marcia Melo, Almir, Adriano, Pedro Izidro, Sara Vilar, Sônia Lima, Norma

Lúcia, Carlos Peña, Clebert José, Marcelo Sá, Adílio Santos, José Morais, Patrícia Brandão, Graça Xavier, Edísio Oliveira, Cláudia Morgana e Sérgio Azevedo.

À Felício Garino Júnior por todo o conhecimento compartilhado e ajuda na realização da identificação bacteriana, muito obrigada.

Ao professor Adílio Santos pela ajuda prestada nas coletas de medula óssea dos animais.

À minha turma, pelos cinco anos de convivência que me ensinaram a conviver com as diferenças e especialmente à quem tenho um carinho especial Iana Carolina, Aline Guedes, Aline Antas, Cristiane Melo, Kamila Nunes, Angélica Bernardo, Adelman Nóbrega, Iácome Suellinton e Carlos Ticiano.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido Aline Antas, Kamila Nunes, Tereza Emmanuele, Expedito Camboim, Arthur Pombo, Gilzane Nóbrega e Daniele por toda a ajuda prestada e pela amizade.

Aos funcionários da UFCG, Damião que em muitos momentos foi nosso “anjo da guarda”, Dona Francinete quem muito me ajudou neste projeto, Rômulo, Reginaldo (Dal), Rosileide, Tereza e Maria Célia (Celinha).

Ao Hospital Veterinário da UFCG e ao Centro Médico Veterinário Dr. Leonardo Torres por ajudar na obtenção das amostras.

Às pesquisadoras do Instituto Biológico de São Paulo, Rosa Maria Piatti, Eliana Scarcelli Pinheiro e Margareth Élide Genovez, pela realização da PCR gênero-específica

Aos meus voluntários do Projeto de Iniciação Científica, Iana Carolina, Carla Lauise, Adelman Nóbrega e Arthur Brasil, a ajuda de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho, muito obrigada.

A todos os proprietários que consentiram as colheitas de sangue e a seus animais, que mesmo sem saberem contribuíram significativamente para esta pesquisa.

Enfim a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE QUADROS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Histórico.....	15
2.2. Etiologia.....	15
2.3. Importância.....	18
2.4. Ocorrência da brucelose canina no Brasil.....	20
2.5. Hospedeiros.....	22
2.6. Transmissão.....	22
2.7. Patogenia.....	23
2.8. Aspectos imunológicos.....	25
2.9. Sinais clínicos.....	25
2.10. Lesões.....	28
2.11. Diagnóstico.....	29
2.11.1. Diagnóstico sorológico.....	30
2.11.2. Diagnóstico bacteriológico.....	34
2.11.3. Diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase.....	36
2.12. Tratamento.....	38
2.13. Controle e Prevenção.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1. Animais.....	42
3.2. Caracterização da área.....	42
3.3. Amostragem.....	42
3.4. Colheitas de sangue.....	43
3.5. Questionário epidemiológico.....	43

3.6. Diagnóstico sorológico da infecção por <i>Brucella canis</i>.....	43
3.7. Análise de fatores de risco associados à soropositividade para <i>Brucella canis</i>.....	45
3.8. Confecção do mapa georreferenciado.....	45
3.9. Cultivo e isolamento de <i>Brucella canis</i>.....	46
3.9.1. Confirmação das estirpes isoladas.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Esquema simplificado da membrana externa da parede celular de <i>Brucella</i> . O LPS das formas lisas está constituído pelo lípido O, o núcleo e o polissacarídeo O (cadeia O). As formas rugosas não possuem a cadeia O ou ela está reduzida a resíduos. Fonte: CASTRO et al., 2005.	17
Figura 2 - Aborto causado pela infecção por <i>B. canis</i> com feto autolisado.	27
Figura 3 - Orquite e epididimite provocadas pela infecção por <i>B. canis</i> .	28
Figura 4 - Kit de diagnóstico para a realização da Imunodifusão em Gel de Ágar.	44
Figura 5 - Perfuração do gel de ágar em lâmina.	44
Figura 6 - Distribuição dos soros no gel de ágar.	45
Figura 7 - Cultivo das amostras em ágar- <i>Brucella</i> com 5% de sangue ovino.	46
Figura 8 - Resultado da técnica de IDGA aplicada à brucelose por <i>Brucella canis</i> em 193 cães do município de Patos, Paraíba.	48
Figura 9 - Reação positiva na IDGA para brucelose.	48
Figura 10 - Mapa do município de Patos demonstrando a localização geográfica das residências dos cães soropositivos e soronegativos. Detalhe ilustrando a localização do município de Patos no Estado da Paraíba.	49
Figura 11 - Colônias bacterianas cultivadas em ágar- <i>Brucella</i> , isoladas de medula óssea de cão.	54
Figura 12 - Resultados da amplificação por PCR para detecção de <i>Brucella</i> spp.: 1- Marcador de peso molecular (DNA 100 pb <i>Ladder</i> – Invitrogen), 2 e 3- Amostra isolada, 4-Controle positivo (<i>Brucella abortus</i> - ATCC 544), 5-Controle negativo (água).	55

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Ocorrência de Brucelose Canina causada por <i>Brucella canis</i> em diversas cidades e estados brasileiros.	20
Tabela 2 - Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para <i>Brucella canis</i> em 193 cães do município de Patos, Paraíba.	51
Tabela 3 - Resultado da análise de regressão logística múltipla para os fatores de risco associados com a soropositividade para <i>Brucella canis</i> em 193 cães do município de Patos, Paraíba.	52
Tabela 4 - Provas bioquímicas utilizadas para identificação das amostras isoladas da medula óssea de um cão soropositivo para <i>Brucella canis</i> .	54

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 - Classificação das espécies de <i>Brucella</i> segundo as características das colônias.	16
Quadro 2 - Características bioquímicas da <i>Brucella canis</i> de acordo com Alton et al. (1988) apud Azevedo (2002).	18

RESUMO

FERNANDES, ANNIELLE REGINA DA FONSECA. Levantamento epidemiológico da brucelose canina no município de Patos, Paraíba. Patos, UFCG. 2009. 71 p. (Monografia do Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal)

O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães do município de Patos, Estado da Paraíba, identificar fatores de risco associados à soropositividade, e confirmar a infecção por cultivo microbiológico e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Soros sanguíneos de 193 cães foram testados pela prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198, para o diagnóstico sorológico da infecção. Para o isolamento de *Brucella canis*, foram procedidos hemocultivo e cultivo de medula óssea de animais soropositivos. Seis animais foram soropositivos na IDGA, resultando em uma soroprevalência de 3,11% (IC 95% = 1,15% – 6,64%). Foi isolada *Brucella canis* da medula óssea de um animal soropositivo, com confirmação pela PCR. A não realização de limpeza no ambiente dos animais foi identificada como fator de risco (odds ratio = 7,91). O presente trabalho é o primeiro a relatar o isolamento de *Brucella canis* em cães do Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: brucelose canina, prevalência, cultivo microbiológico, Nordeste do Brasil

ABSTRACT

FERNANDES, ANNIELLE REGINA DA FONSECA. Epidemiological survey for canine brucellosis in Patos city, Paraíba. Patos, UFCG. 2009, 71 p. (Monograph of the Course of Veterinary Medicine, Veterinary Medicine Prevent and Animal Health)

The aim of this work was to determine the prevalence of anti-*Brucella canis* antibodies in dogs from Patos municipality, Paraíba State, as well as to identify risk factors associated with seropositivity, and to confirm the infection by microbiological culture and Polymerase Chain Reaction (PCR). Sera from 193 dogs were tested by the agar gel immunodiffusion test (AGID), using lipopolysaccharides and proteins antigens from *Brucella ovis*, strain Reo 198, for the serological diagnosis of the infection. For the isolation of *Brucella canis* blood and bone marrow cultures from seropositive animals were carried out. Six animals tested seropositive in AGID, resulting in a seroprevalence of 3.11% (95% CI = 1.15% – 6.64%). *Brucella canis* was isolated from bone marrow from one seropositive animal, with confirmation by PCR. Do not clean the environment in which the animals stay it was identified as risk factor (odds ratio = 7.91). The present work was the first on reporting the *Brucella canis* isolation from dogs in the Northeast region of Brazil.

Keywords: canine brucellosis, prevalence, microbiological culture, Northeast region of Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Os cães de companhia estão cada vez mais inseridos na sociedade, ocupando lugares especiais dentro da família, de modo que grande atenção deve ser voltada para a sanidade desses animais, especialmente no que diz respeito àquelas doenças naturalmente transmissíveis entre animais e seres humanos, as zoonoses.

A brucelose canina é uma enfermidade infecto-contagiosa de potencial zoonótico cujo agente etiológico é a *Brucella canis*, uma bactéria que é responsável pelo comprometimento do aparelho reprodutivo, principalmente por abortos e esterilidade nas fêmeas além de orquite e epididimite nos machos, tendo, portanto, uma relevante importância econômica para os criadores de cães em virtude dos problemas reprodutivos acarretados.

O caráter zoonótico da doença deve ser considerado devido à complexa e estreita relação com a população humana, especialmente com crianças, causando infecções relativamente moderadas e assintomáticas. Estes fatos têm sido comprovados através dos relatos de casos humanos de infecção por *B. canis* e também através dos trabalhos de prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em soros humanos.

A real incidência da brucelose canina em humanos, embora venha sendo pesquisada desde a década de 1960, ainda não é conhecida. Mais de 35 casos da doença, de acordo com registros oficiais, foram apontados tanto em infecções naturais como aquelas adquiridas em laboratório como doença ocupacional.

Nos animais, somente com o exame clínico, não é possível chegar ao diagnóstico da infecção, uma vez que, diferente das outras infecções sistêmicas, eles estão aparentemente sadios.

O diagnóstico etiológico, portanto, é efetuado por métodos laboratoriais indiretos e diretos, através da detecção de anticorpos presentes no soro sanguíneo ou pelo isolamento da bactéria nos animais infectados além de métodos moleculares. O isolamento bacteriano pode ser feito através de cultivo de sangue e das secreções dos animais infectados e, embora forneça um diagnóstico definitivo, é um procedimento laborioso e demorado podendo apresentar resultados falso-negativos. Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo largamente utilizados para o diagnóstico da brucelose canina, possibilitando a detecção de DNA da bactéria em diversas amostras.

Os testes sorológicos são mais práticos, rápidos e fáceis de executar possibilitando a realização de um número considerável de amostras. Destas provas, a que está sendo amplamente utilizada é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), que tem sido de grande aplicação e praticidade porque os anticorpos anti-*Brucella canis* podem ser detectados dentro de 8 a 12 semanas após a infecção.

Devido à escassez de informações públicas acerca da ocorrência de brucelose por *B. canis* em cães do município de Patos, Estado da Paraíba, bem como a ausência de relatos de isolamento da bactéria no Nordeste brasileiro, e tendo em vista a importância da doença para a saúde pública, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães do referido município, identificar os fatores de risco associados à soropositividade nesses animais e confirmar a infecção por cultivo microbiológico e técnica de PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

A primeira espécie do gênero *Brucella* foi isolada em 1887, por David Bruce, de baços de militares que morreram na Ilha de Malta, o organismo foi denominado de *Micrococcus melitensis*. Dez anos mais tarde, um veterinário holandês chamado Bang isolou do útero e membranas fetais oriundas de abortamentos de fêmeas bovinas, um microrganismo que foi chamado de *Bacillus abortus*. Em 1918, Alice Evans demonstrou que os microrganismos descritos por Bruce e Bang eram muito semelhantes entre si. Foi criado então em homenagem à Bruce o gênero *Brucella* (BIER, 1990; HIPÓLITO et al., 1965; NIELSEN e DUNCAN, 1990 apud VIEIRA, 2004).

A brucelose canina foi descrita, pela primeira vez, por Carmichael, em 1966, nos Estados Unidos durante os episódios de abortamentos em New Jersey, onde foi isolado um microorganismo cocobacilar Gram negativo da placenta e tecidos fetais de cadelas que abortaram, similar a outros membros do gênero *Brucella*, no entanto, a característica rugosa das colônias e as diferenças em reações bioquímicas e antigênicas da bactéria permitiram o estabelecimento de uma nova espécie, a *Brucella canis* (CARMICHAEL e BRUNNER, 1968 apud AZEVEDO, 2002; MOORE e BENNET, 1967)). Posteriormente, a doença foi observada em diversos países, tanto em investigações que detectaram anticorpos anti-*Brucella canis* como também em ocasiões nas quais foi possível o isolamento do agente.

2.2. Etiologia

O gênero *Brucella* é constituído por bactérias intracelulares facultativas, com seis espécies reconhecidas, cada uma delas acometendo um hospedeiro preferencial. São identificadas de acordo com esse hospedeiro, características morfológicas, propriedades metabólicas, além de sorotipagem e fagotipagem (ALTON, 1976 apud KEID, 2006).

Embora estudos com hibridização DNA-DNA indiquem que toda *Brucella* pertence a uma única genoespécie, muitos autores preferem adotar as denominações tradicionais em virtude desses microrganismos exibirem preferências por hospedeiros e diferirem quanto à gravidade da doença causada. Susceptibilidade a corantes e a fagocitose juntamente com as

características bioquímicas, sorológicas e de cultura, são utilizadas para diferenciação entre espécies (WALKER, 1999). As seis espécies de *Brucella* são: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. suis*.

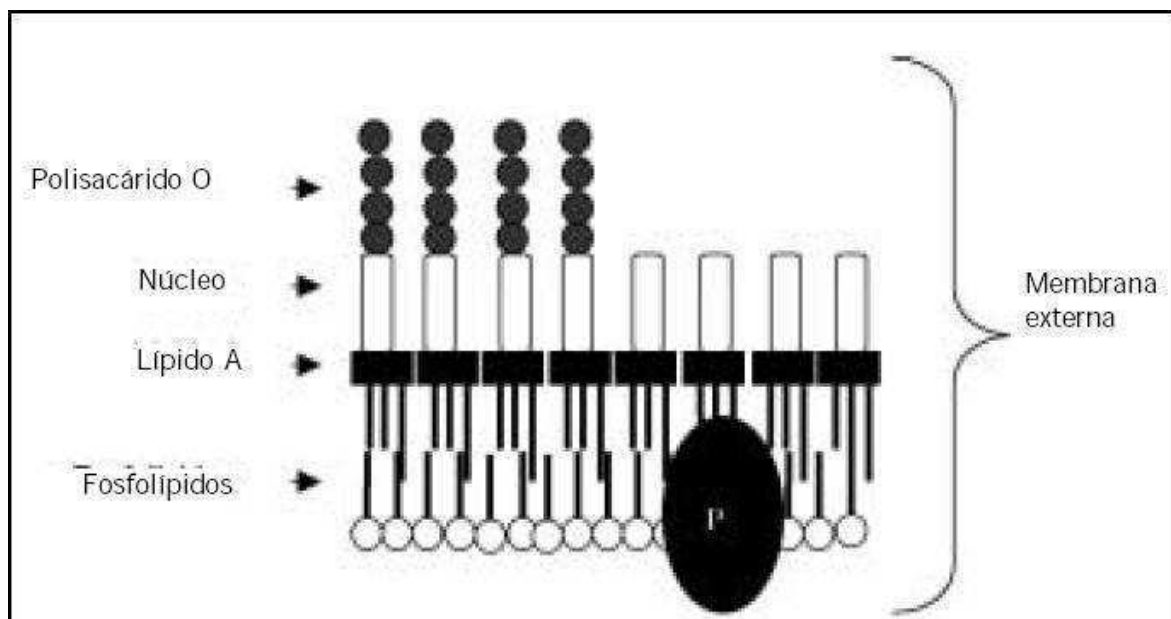
A *Brucella abortus* é o principal agente etiológico da brucelose em bovinos e búfalos, a *B. melitensis* é responsável pela doença em caprinos e ovinos e a *B. suis* acomete principalmente os suínos. A *B. ovis* e *B. canis* causam respectivamente a epididimite em ovinos e a brucelose canina, enquanto a *B. neotomae* foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida*. Além destas, estirpes de *Brucella* também tem sido isolada de mamíferos marinhos com características fenotípicas e genotípicas distintas das seis espécies já reconhecidas (ALTON et al., 1988 apud VIEIRA, 2004; NIELSEN e DUNCAN, 1990 apud VIEIRA, 2004; FOSTER et al., 2002).

Com base no aspecto das colônias obtidas em meios sólidos, as diferentes espécies de *Brucella* se classificam habitualmente como lisas (S) ou rugosas (R) (Quadro 1). Esse aspecto se deve a presença de certas diferenças nas características de sua membrana externa.

O componente mais abundante e melhor estudado da membrana externa de *Brucella* é o Lipopolissacarídeo (LPS). Nele se distingue três regiões: o lipídio A, um oligossacarídeo intermediário, chamado núcleo, e o polissacarídeo O, também conhecido como cadeia O, ausente ou presente com poucos resíduos nas formas rugosas (Figura 1) (CASTRO et al., 2005). Esse lipopolissacarídeo está diretamente associado à virulência desempenhando um papel na sobrevivência intracelular (WALKER, 1999).

Quadro 1 - Classificação das espécies de *Brucella* segundo as características das colônias.

CLASSIFICAÇÃO	ESPÉCIE
Brucelas lisas ou clássicas	<i>B. abortus</i>
	<i>B. melitensis</i>
	<i>B. suis</i>
	<i>B. neotomae</i>
Brucelas rugosas	<i>B. ovis</i>
	<i>B. canis</i>



Fonte: CASTRO et al., 2005.

Figura 1 - Esquema simplificado da membrana externa da parede celular de *Brucella*. O LPS das formas lisas está constituído pelo lipídeo A, o núcleo e o polissacarídeo O (cadeia O). As formas rugosas não possuem a cadeia O ou ela está reduzida a resíduos.

A *B. canis* é uma bactéria gram-negativa na forma de coco-bastonete, aeróbica ou microaerófila, sem cápsula, sem flagelos e não formadora de esporos (MOORE e BENNETT, 1967; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998). Cresce bem em meios enriquecidos como ágar-*Brucella* (acrescido de 5% de sangue ovino), ágar soja trypticase, ágar triptose e meio de Tayer-Martin (QUINN et al., 1994; CARMICHAEL e GREENE, 1998). O crescimento é demorado, onde em dois a três dias são observadas colônias maduras com 1,0-1,5 mm de diâmetro, não hemolíticas, translúcidas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos e coloração levemente leitosa, podendo adquirir um tom acinzentado quando velhas (ALTON et al., 1988 apud AZEVEDO, 2002). De acordo com esse mesmo autor, as características bioquímicas da bactéria estão simplificadas no quadro 2, no entanto, há registros de variabilidade na produção de H₂S (RIECKE e RHOADES, 1975; LARSSON e COSTA, 1980) e no crescimento na presença dos corantes tionina e fucsina básica (LARSSON e COSTA, 1980; GOMES et al., 1999).

Quadro 2 - Características bioquímicas da *Brucella canis*.

PROVA BIOQUÍMICA	CRESCIMENTO
Urease	+
Produção de H ₂ S	-
Redução de nitrato	+
Oxidase	+
Catalase	+
Motilidade	-
Citrato	-
Crescimento em meio de cultura Mac Conkey	-
Crescimento em presença de Tionina *	+
Crescimento em presença de Fucsina básica **	+

Fonte: Alton et al. (1988) apud Azevedo (2002).

* nas concentrações 1:25.000, 1:50.000 e 1:100.000

** nas concentrações 1:50.000 e 1:100.000

2.3. Importância em saúde pública e econômica

Os cães de companhia apresentam nos dias de hoje, uma inserção muito grande na sociedade. Além da companhia para crianças, idosos ou para toda a família, podem desempenhar funções como cães-guia para cegos e cães de guarda. Isso faz com que a indústria de produtos para pequenos animais cresça vertiginosamente a cada ano além do que a crescente importância conferida pela sociedade aos animais de companhia faz com que grande atenção seja dispensada à sanidade desses animais. Com isso, atenção deve ser dada à brucelose canina, que acarreta problemas reprodutivos em machos e fêmeas, prejuízos ao criador de cães e ainda é uma importante zoonose (MINHARRO et al. 2005). No entanto, nesse contexto de saúde pública, o cão foi por muito tempo negligenciado como fonte de infecção de brucelose para o homem, pois apresenta resistência relativa natural à infecção por *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis* (CARMICHAEL, 1990). O caráter zoonótico da brucelose canina deve ser considerado em face da complexa relação da população canina com os seres humanos (CÔRTEZ et al., 1988) e principalmente pelo estreito contato estabelecido entre cães e crianças. Vale

salientar que a facilidade com que algumas espécies do gênero *Brucella* podem ser transmitidas (direta ou indiretamente) aos animais e ao homem mostra a importância no controle desta enfermidade.

Esse potencial zoonótico foi constatado em 1969, quando do registro de infecções em seres humanos decorrentes de acidentes de laboratório (MORISSET e SPINK, 1969 apud KEID, 2006). Desde então, casos de infecção humana por *B. canis* vêm sendo descritos, tanto aquelas adquiridas em laboratórios como doença ocupacional (GODOY et al., 1979; WALLACH et al., 2004), quanto os decorrentes do estreito convívio estabelecido entre cães e o homem (BLANKENSHIP e SANFORD, 1975; LUCERO et al. 2005 a,b; MUNFORD et al., 1975; ROXO et al., 1990; RUMLEY e CHAPMAN, 1986 apud KEID, 2006; SWENSON et al., 1972). O contato com cadelas que abortaram constitui a forma de contágio mais freqüente, no entanto há alguns relatos de exposição relacionada a cães machos e inclusive alguns casos nos quais não foi possível a identificação da fonte de infecção (CARMICHAEL e GREENE, 1990; POLT et al., 1982; ROUSSEAU, 1985 apud KEID, 2006).

Esses relatos de infecção humana são baseados tanto em evidências sorológicas, através dos trabalhos de prevalência de aglutininas anti-*Brucella canis* em soros humanos (LARSSON, 1980; LEWIS JR. e ANDERSON, 1973; HOFF e SCHNEIDER, 1975; BARG et al., 1977), quanto bacteriológicas, comprovados através dos relatos de casos humanos de infecção pelo agente (CARMICHAEL et al., 1968; SWENSON et al., 1972; BLANKENSHIP & SANFORD, 1975; LOVEJOY et al., 1976, WALLACH et al., 2004)).

Ainda assim, os seres humanos são relativamente resistentes à infecção por *B. canis* e a doença é branda quando comparada a infecções causadas por outras espécies de *Brucella*. Os principais sinais clínicos são febre, calafrios, fadiga muscular, sudorese profusa, mal-estar, linfadenomegalia e perda de peso. As raras complicações incluem endocardite, miocardite, pericardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais (GREENE e GEORGE, 1984; HARTIGAN, 1997; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Além da importância do ponto de vista de saúde pública, os prejuízos atribuídos à presença de *B. canis* em criações de cães também devem ser considerados. Os prejuízos são em consequência das perdas econômicas derivadas de abortamento e infertilidade, assim como de perda de patrimônio genético decorrente da infecção em animais de alto valor zootécnico (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; JONES e EMERSON, 1984; KEID

et al., 2004a; MYERS e VARELA-DIAZ, 1980; MOORE et al, 1968; PICKERILL e CARMICHAEL, 1972).

2.4. Ocorrência da brucelose canina no Brasil

No Brasil, a presença de cães infectados por *Brucella canis* foi confirmada, tanto por investigações que isolaram o agente (FERNANDES et al., 1976/77; GODOY et al.; 1977; LARSSON, 1979; LARSSON & COSTA, 1980; VARGAS et al., 1996; GOMES et al., 1999), como por inquéritos sorológicos que identificaram a presença de anticorpos séricos contra *B. canis* (WALD & FERNANDES, 1976/1977; GODOY et al., 1977; GERMANO et al., 1987; CÔRTEZ et al., 1988; ALVES et al., 1999; MEGID et al., 1999; ALMEIDA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2003). A primeira observação no país sobre a infecção causada pela *B. canis* foi de Sandoval et al., (1976), que detectaram 3,61%, dentre as 221 amostras de cães apreendidos pelo centro de zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo.

De acordo com Keid (2006) observa-se uma ocorrência que varia entre 1,32% e 72,7% de acordo com a região, a população de cães examinada e o teste de diagnóstico empregado. A tabela 1 demonstra os valores de prevalência da enfermidade em vários estados do Brasil.

Tabela 1 – Ocorrência de brucelose canina causada por *Brucella canis* em diversas cidades e estados brasileiros.

LOCAL	AUTORES	Nº DE ANIMAIS	MÉTODO	RESULTADO
Belo Horizonte – MG	Godoy et al., 1977	76	SAR e SAL	1,32% (1/76)
			Hemocultura	1,32% (1/76)
Uruguaiana – RS	Vargas et al., 1996	12	IDGA	72,7% (8/12)
			Cultivo de placenta e fetos	16,6% (2/12)
Rio de Janeiro – RJ	Vieira et al., 2000	146	IDGA	19,17% (28/146)

LOCAL	AUTORES	Nº DE ANIMAIS	MÉTODO	RESULTADO
Belém – PA	Mólnar et al., 2001	236	IDGA	45,37% (107/236)
			FC	38,56% (91/236)
			ELISA	46,14% (109/236)
Belo Horizonte – MG	Souza et al., 2002	1368	IDGA	4,8% (65/1368)
Patos – PB	Alves et al., 2003	274	IDGA	3,6% (10/274)
Santana de Parnaíba – SP	Azevedo et al., 2003	410	IDGA	9,51% (39/410)
			IDGA-2ME	3,65% (15/410)
			FC	3,41% (14/410)
Alfenas – MG	Almeida et al., 2004	635	IDGA	14,2% (90/635)
São Paulo – SP	Keid et al., 2004 ^a	171	IDGA	33,91% (58/171)
			Hemocultura	14,03% (24/171)
Salvador – BA	Cavalcanti et al., 2006	85	IDGA	5,88% (5/85)
Campina Grande- PB	Vasconcelos et al., 2008	170	IDGA	2,35% (4/170)

Legenda: SAR: Soroaglutinação rápida IDGA: Imunodifusão em gel de Agar ELISA: Ensaio imunoenzimático
 SAL: Soroaglutinação lenta FC: Fixação de complemento

A importância dos trabalhos de prevalência está na evidência de que a infecção por *B. canis* está disseminada no país. Isto alerta para a necessidade de que os médicos veterinários busquem diagnosticar nos seus pacientes a possível ocorrência da doença e de

se impedir a entrada da brucelose canina em um plantel, identificando precocemente os animais infectados, principalmente quando houver histórico de fêmeas que abortaram no terço final de gestação ou de animais com baixo desempenho reprodutivo, para diminuir as perdas econômicas e evitar a infecção humana (MINHARRO et al., 2005).

2.5. Hospedeiros

Ao contrário das demais brucelas que infectam várias espécies domésticas, a *B. canis* acomete preferencialmente os canídeos (CARMICHAEL, 1998), entretanto, já houve o registro de felinos soropositivos (RANDHAWA et al., 1977; LARSSON et al., 1984a) e também foi investigado o comportamento de felinos experimentalmente infectados (PICKERILL, 1970). Cobiaios, camundongos, ratos e primatas são susceptíveis à infecção experimental. O coelho é o animal de laboratório mais susceptível e apresenta orquite e abscesso peritoneal após a inoculação intraperitoneal de altas doses do agente (CARMICHAEL, 1998).

Os cães também podem ser acometidos por outras espécies de *Brucella*, como: *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*, no entanto, tais infecções são de ocorrência esporádica e geralmente resultam do contato de cães da zona rural com produtos de origem animal contaminados ou da ingestão de restos de abortamentos brucélicos (CLEGG e RORRISON, 1968; ROBERTSON, 1973; BARR et al., 1986; FORBES, 1990).

2.6. Transmissão

A transmissão do agente ocorre mais comumente por contato direto, através da ingestão ou inalação de microorganismos provenientes de materiais de abortamento e descargas vaginais bem como através de manipulação dos mesmos (JOHNSON e WALKER, 1992; WANKE, 2004).

O contato com fetos e placentas de fêmeas que abortaram constitui a forma de transmissão mais comum, assim como secreções vaginais provenientes de cadelas que abortaram (quatro a seis semanas pós-abortamento) e de cadelas em estro (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; CARMICHAEL e GREENE, 1990; CICUTA e MIRANDA, 1990;). Entretanto, de acordo com Johnson e Walker (1992) essa eliminação vaginal pode ocorrer em períodos variáveis nas fêmeas não gestantes e que não apresentam-se em estro.

A transmissão venérea também pode ocorrer (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; DZIEZYC, 2000) assim como a congênita, que constitui a principal via de transmissão para os filhotes.

Transmissão por fômites, tais como vaginoscópios, seringas contaminadas, transfusão sangüínea e inseminação artificial, já foi relatada, mas a *B. canis* não persiste por muito tempo no meio ambiente e é facilmente destruída pelos desinfetantes comuns (CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Devido ao elevado número de bactérias presentes no sêmen de cães infectados, especialmente entre três e onze semanas após a infecção, o mesmo também pode servir como importante via de eliminação, entretanto, a bactéria não pode ser recuperada do sêmen 60 semanas após a infecção (GEORGE et al., 1979).

A urina é um material potencialmente infectante, mas muitas vezes é necessário meses de contato para que ocorra a infecção (CARMICHAEL e GREENE, 1998). A eliminação urinária inicia-se entre quatro e oito semanas após a infecção e, de maneira geral, considera-se que a concentração de bactérias na urina dos animais machos é superior à concentração nas fêmeas devido à presença do agente na próstata e epidídimos. Nestes dois últimos órgãos, os animais cronicamente infectados podem abrigar o agente durante meses depois de cessada a bacteremia e eliminá-lo eventualmente via sêmen ou urina. (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1990; CARMICHAEL e SHIN, 1996; JOHNSON e WALKER, 1992; SERIKAWA et al, 1977; SERIKAWA et al., 1978; SERIKAWA e MURAGUCHI, 1979).

A transmissão através do leite é possível, embora não seja tão importante, pois os filhotes usualmente adquirem a infecção durante a vida uterina (DZIEZYC, 2000).

Pequenas quantidades da bactéria foram isoladas de materiais como a saliva, secreções nasais e oculares, além de fezes de cães infectados, entretanto, apresentam uma menor importância na transmissão da doença (JOHNSON e WALKER, 1992; SERIKAWA et al. 1977; SERIKAWA e MURAGUCHI, 1979; WANKE et al., 2004 apud KEID, 2006).

2.7. Patogenia

A infecção pela *B. canis* pode ocorrer através das membranas mucosas oral, nasal, conjuntival e genital, bem como através da placenta e lesões na pele (MOORE, 1969;

GREENE e GEORGE, 1984; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998; DZIEZYC, 2000). A via oral é mais comum, com a dose infectante mínima de 10^6 microorganismos, enquanto que, pela via conjuntival, varia de 10^4 a 10^5 microorganismos. A dose infectante mínima pela via venérea ainda é desconhecida (CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Após a penetração no organismo do hospedeiro, a *B. canis* é fagocitada por macrófagos e outras células fagocitárias, resiste às enzimas dos fagócitos e é transportada aos linfonodos regionais, provocando uma linfadenopatia periférica (AZEVEDO, 2002).

A partir do sistema linfático, a bactéria atinge a circulação sanguínea, acarretando bacteremia, disseminando-se para outros órgãos sendo detectável dentro de duas a quatro semanas pós-infecção, podendo persistir por seis a 64 meses. A bactéria passa a se replicar no interior de leucócitos ou no tecido linforeticular, como fígado, baço e linfonodos, podendo provocar hiperglobulinemia (SUZUKI et al., 2008).

Os órgãos reprodutivos que podem ser infectados incluem o útero nas fêmeas gestantes (tecido gonadal de dependência esteroideogênica) e o testículo, epidídimo e a próstata nos machos (CARMICHAEL e KENNEY, 1970; GREENE e GEORGE, 1984; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Nas fêmeas gestantes, a *B. canis* coloniza e multiplica-se nas células epiteliais da placenta, levando à morte embrionária, fetal ou abortamento. Algumas vezes a fêmea consegue chegar ao final da gestação, porém os filhotes morrem em poucas horas ou dias após o nascimento (JOHNSON e WALKER, 1992). A bactéria provavelmente invade o feto através da placenta, entretanto, há uma elevada concentração de bactérias no fluido amniótico, presença de leucócitos no lúmen estomacal e no trato intestinal de filhotes abortados, o que sugere a possibilidade de infecção do feto como consequência da ingestão de fluido amniótico (CARMICHAEL e KENNEY, 1970).

Ocasionalmente infecta outros tecidos como ossos, olhos, meninges, rins e pele. Esses tecidos podem constituir sítios de persistência bacteriana, caracterizando a fase crônica da infecção, quando então é cessada a bacteremia. Já foram relatadas uveíte, discoespondilite, osteomielite, meningite, glomerulonefrite e dermatite piogranulomatosa causadas por *B. canis* (HENDERSON et al., 1974; RIECKE e RHOADES, 1975; DAWKINS et al., 1982; GORDON et al., 1985; TURNWALD et al., 1986 apud AZEVEDO, 2002; SMEAK et al., 1987; KERWIN et al., 1992; DZIEZYC, 2000).

2.8. Aspectos imunológicos

Vários mecanismos são utilizados pelas brucelas para permitir sua sobrevivência no interior das células fagocitárias sendo capazes de sobreviver e multiplicar-se dentro dos macrófagos inibindo a fusão do fagolisossoma. Essa sobrevivência intracelular em macrófagos e, em menor grau, em neutrófilos, é aumentada por supressão do sistema halóide-H₂O₂-mieloperoxidase. Além de evadir dos mecanismos oxidativos, a *B. canis* promove ainda a produção de superóxido-dismutase e catalase. Proteínas de estresse foram demonstradas em *Brucella* podendo ser um fator para a sobrevivência intracelular no hospedeiro, e acredita-se que elas atuam protegendo os microrganismos de enzimas hidrolíticas, radicais de oxigênio e sistemas destruidores de mieloperoxidase no fagolisossoma (WALKER, 1999; SUZUKI et al., 2008).

Como essas células fagocíticas tornam-se incapazes de eliminar o agente, acabam desempenhando um papel na disseminação do mesmo para outras partes do corpo e na persistência da infecção (WALKER, 1999).

A resposta imune, contra *Brucella*, é predominantemente celular, assim como em outros microrganismos intracelulares. Uma elevação nos níveis de anticorpos séricos pode ocorrer, porém estes não são protetores e apresentam pouca influência na redução da bacteremia e no número de organismos teciduais (CARMICHAEL e GREENE, 1990).

A natureza eficaz da imunidade, sobretudo celular, é especialmente mediada por linfócitos T, que sensibilizados, liberam citocinas e estas ativam os macrófagos, que por sua vez controlam o agente por intermediários do oxigênio reativo. Nos cães ainda há a presença de auto-anticorpos IgA causando sérios efeitos na fertilidade dos animais (WALKER, 1999).

2.9. Sinais clínicos

Os sinais clínicos estão comumente relacionados a distúrbios do trato reprodutivo tanto em machos como em fêmeas, e, na maioria dos casos, mesmo sendo uma infecção de caráter sistêmico, os animais estão aparentemente sadios (assintomáticos), comportando-se como importantes fontes de infecção. Podem apresentar alguns sinais inespecíficos como letargia, perda da libido, envelhecimento precoce, linfadenopatia generalizada, pelagem seca e sem brilho, perda do vigor, anorexia, perda de peso, depressão e intolerância ao

exercício (CARMICHAEL, 1998; RIECKE e RHOADES, 1975)

Mesmo durante a bacteremia, normalmente não ocorre febre, devido à ausência de endotoxinas (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e KENNEY, 1968; WANKE et al., 2004 apud KEID, 2006).

Nas fêmeas infectadas, o abortamento seguido por secreção vaginal, bem como morte e reabsorção embrionária ou falha de concepção são os principais sinais clínicos observados (CARMICHAEL e KENNEY, 1968).

O abortamento é mais comum entre 45 e 59 dias de gestação (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998; WANKE, 2004). Embora o abortamento ocorra mais freqüentemente no terço final, a gestação também pode ser interrompida em outras etapas. Se a gestação não é interrompida, os filhotes nascem fracos e muitos não conseguem viver até a puberdade, mas se algum dos neonatos sobrevive, apresenta linfadenopatia periférica como primeira manifestação clínica da doença até que ele alcance a maturidade sexual. Muitos filhotes apresentam hiperglobulinemia persistente, febre transitória ou leucocitose (JOHNSON e WALKER, 1992; DZIEZYC, 2000).

Nas cadelas que abortam, a secreção vaginal pode durar de uma a seis semanas apresentando-se com aspecto mucóide, serosanguinolenta ou purulenta leve a moderado (CARMICHAEL e KENNEY, 1968). Pode ocorrer morte embrionária também entre 10 e 20 dias de gestação. Nesses casos, ocorre morte e há reabsorção fetal, o proprietário não percebe a perda da ninhada e admite que a concepção não tenha ocorrido (JOHNSON e WALKER, 1992; DZIEZYC, 2000). Não são observados outros sinais clínicos além de linfadenopatia em fêmeas não gestantes, mas existem relatos de vaginite e endometrite (CARMICHAEL e KENNEY, 1970).

Há ainda casos em que as fêmeas apresentam ninhadas subseqüentes normais, após um período de abortamento. Estima-se que 85% das fêmeas que abortam apresentam esse quadro, apesar de continuarem infectadas, disseminando então a doença, além de que falhas reprodutivas intermitentes também podem ser observadas após gestações normais (CARMICHAEL e KENNEY, 1970; CARMICHAEL, 1990; SPINK, 1970).

Os fetos abortados apresentam-se parcialmente autolisados (Figura 2) e com lesões características de infecção bacteriana generalizada: edema subcutâneo, congestão e hemorragia em região subcutânea abdominal, fluido peritoneal sero-sanguinolento com infiltrado de células inflamatórias, lesões degenerativas no fígado, baço, rins e intestinos (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; CARMICHAEL e GREENE, 1990; WANKE et al.,

2004 apud KEID, 2006).



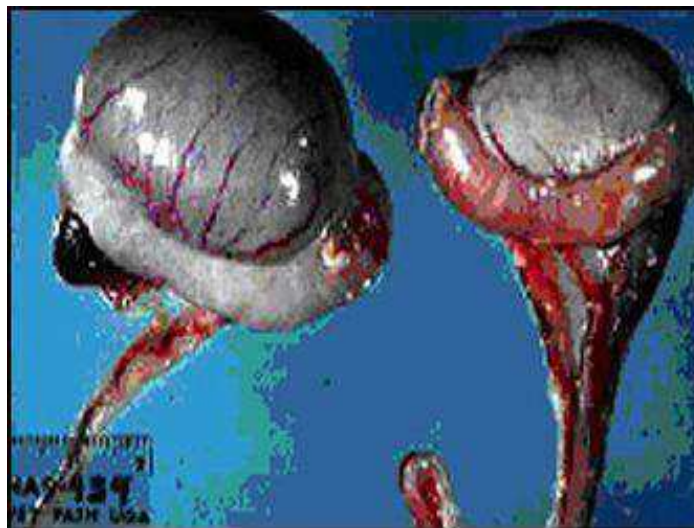
Fonte: <http://www.ppublicationsroyalcanin.com/images22472p256.jpg>

Figura 2 - Aborto causado pela infecção por *B. canis* com feto autolisado.

Nos machos infectados, pode ocorrer epididimite uni ou bilateral, orquite (Figura 3) e prostatite (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; CARMICHAEL, 1976; MOORE, 1969; CARMICHAEL e KENNEY, 1970; CARMICHAEL, 1976; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998; SCHOEB e MORTON, 1978). Observa-se também o aumento da circunferência escrotal, devido ao acúmulo de líquido serosanguinolento na túnica vaginal e dermatite escrotal associada à infecção bacteriana secundária (MOORE, 1969; CARMICHAEL e KENNEY, 1970; SCHOEB e MORTON, 1978; CARMICHAEL, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998). Animais com infecção crônica podem desenvolver atrofia testicular uni ou bilateral (CARMICHAEL e KENNEY, 1968; MOORE, 1969; MOORE e GUPTA, 1970; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998). Pode ocorrer diminuição do volume do ejaculado sem perda da libido e dor aguda não é evidente durante a palpação do escroto ou testículo, porém percebe-se certo desconforto durante a ejaculação (CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

O sêmen de animais infectados contém grande número de espermatozoides anormais e células inflamatórias, principalmente durante os três primeiros meses após a infecção (CARMICHAEL, 1998). As principais alterações incluem espermatozoides imaturos, cauda dobrada, retenção da gota citoplasmática e inchaço da peça intermediária,

além de grupos de células inflamatórias. Machos com infecção crônica podem apresentar azoospermia (GEORGE et al., 1979; JOHNSON e WALKER, 1992).



Fonte: www.bullmountain.com.br/sitefaladoutora

Figura 3 - Orquite e epididimite provocadas pela infecção por *B. canis*.

A lesão testicular pode provocar uma resposta auto-imune que produz anticorpos anti-espermatozóides e aglutinação de espermatozóides em região de cabeça geralmente, após 15 a 18 semanas de infecção, resultando em esterilidade (CARMICHAEL e GREENE, 1990; GEORGE et al., 1979; LARSSON, et al., 1984b; SERIKAWA et al., 1981b; SERIKAWA et al., 1984).

Além dos transtornos reprodutivos, sinais e lesões em outros tecidos também são comumente observados como esplenomegalia, discoespondilite, osteomielite, meningite, uveíte, hifema, edema de córnea, glomerulonefrite e dermatite piogranulomatosa (CARMICHAEL e GREENE, 1990; DZIEZYC, 2000; GONZÁLEZ et al., 2004).

Relata-se também recuperação espontânea da infecção entre um e cinco anos pós-infecção. Animais que se recuperaram da infecção apresentam títulos aglutinantes baixos ou ausentes e podem apresentar-se imunes à re-infecção (CARMICHAEL e GREENE, 1990; MOORE e GUPTA, 1970).

2.10. Lesões

A epididimite por *Brucella canis* é caracterizada por infiltração de células

mononucleares, espermatozoides fagocitados por macrófagos e células gigantes, bem como produção de anticorpos anti-espermatozoides (GEORGE e CARMICHAEL, 1984).

Nos casos de orquite há inflamação suave, graus variados de espermatogênese, diminuição do tecido conjuntivo fibroso e áreas com infiltração mononuclear. Nos testículos atroficos há infiltração de células mononucleares e de células de Sertoli, associada à ausência de espermatogênese. A *Brucella canis* infecta a próstata, o que provavelmente explica a presença de um maior número de organismos na urina de machos infectados do que em fêmeas (JOHNSON e WALKER, 1992).

Os animais com infecção crônica podem apresentar endometrite subaguda ou crônica, prostatite granulomatosa, atrofia e fibrose testicular e espessamento da membrana hialina do glomérulo com pequena infiltração celular. Os achados histopatológicos da infecção de canídeos por *B. canis* incluem hiperplasia das células reticulares e linfóides de todos os tecidos, incluindo placas de Payer, vesícula biliar e pálpebras, infiltração de células inflamatórias em todo o trato genito-urinário e vasculite necrótica em tecidos como a próstata, epidídimo e vulva (GREENE e GEORGE, 1984; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

2.11. Diagnóstico

Somente com o exame clínico não é possível o estabelecimento do diagnóstico da infecção pela *Brucella canis*, no entanto, relatos de abortamento no terço final da gestação, falhas na concepção, epididimite, atrofia testicular e dermatite escrotal levantam a suspeita clínica da doença (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Apesar do seu caráter sistêmico, os valores sanguíneos, bioquímicos e urinários normalmente não apresentam alterações (JOHNSON & WALKER, 1992, MEGID et al, 2000), impossibilitando a utilização desses dados quando da suspeita clínica.

Dessa forma, o diagnóstico etiológico é efetuado por métodos laboratoriais indiretos e diretos, através da detecção de anticorpos séricos contra *B. canis* ou do isolamento do microorganismo nos animais infectados, respectivamente.

Pela sua praticidade, os testes sorológicos são os mais comumente usados. As suas vantagens em relação ao isolamento bacteriano são: facilidade na execução, rápido processamento e a possibilidade do exame de um número considerável de amostras (JOHNSON e WALKER, 1992; IRIBARREN et al., 1999; ALMEIDA et al., 2001). A

desvantagem é que, algumas vezes, a maioria dos testes não são específicos para *B. canis* e podem dar resultados falso-positivos.

Em relação ao cultivo bacteriano, o mesmo fornece um diagnóstico definitivo quando a bactéria é isolada, no entanto, é um procedimento muito laborioso, demorado e pode redundar em resultados falso-negativos, uma vez que a bactéria pode se encontrar em vários órgãos (MOORE, 1969; GREENE e GEORGE, 1984; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998; KEID, 2001).

Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui a mais avançada metodologia de diagnóstico rotineiramente utilizado por laboratórios para diagnóstico de doenças infecciosas inclusive a brucelose, possibilitando a detecção específica de genes do agente causador da doença através de sua amplificação e posterior visualização (KEID, 2006).

2.11.1. Diagnóstico sorológico

Apesar de vários testes sorológicos terem sido propostos para diagnosticar a brucelose em cães, os testes que envolvem reações de aglutinação têm sido os mais freqüentemente utilizados (MELO et al., 1997/98), dentre eles a soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta (SAL) e fixação de complemento (FC), além dos testes de precipitação de conjugado como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e testes enzimáticos como o teste de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

As estirpes bacterianas geralmente empregadas para a produção dos antígenos usados nestes testes são a *Brucella ovis* amostra Reo 198, *B. canis* RM6/66 e uma estirpe menos mucóide de *B. canis* (*B. canis* M-) (ZOHA e CARMICHAEL, 1981 apud KEID, 2006).

As provas sorológicas podem utilizar tanto antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa, quanto proteínas presentes no citoplasma bacteriano (KEID, 2006).

Testes baseados em antígenos de superfície são mais utilizados como provas de triagem e apresentam alta sensibilidade no diagnóstico da doença. No entanto esses antígenos também são compartilhados com outros gêneros de bactérias como *Moraxella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* e *Bordetella bronchiseptica*, resultando então na ocorrência de reações cruzadas entre estes e anticorpos não específicos presentes

no soro de animais não infectados (CARMICHAEL e GREENE, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; PICKERILL, 1970; CARMICHAEL et al., 1984 apud KEID, 2006).

No geral, enquanto há persistência da bacteremia, os títulos de anticorpos anti-LPS permanecem elevados. Com o passar do tempo, a tendência é de que ocorra uma redução nos títulos de anticorpos séricos, de modo que os animais permaneçam com títulos baixos ou até mesmo sorologicamente negativos. No entanto, pode haver ainda uma flutuação nos títulos de anticorpos tanto na presença quanto na ausência de bacteremia. (CARMICHAEL e GREENE, 1990; MEGID et al., 2000).

Os animais cronicamente infectados com ausência de bacteremia podem abrigar o agente em diversos tecidos corporais, apresentando nas provas sorológicas resultados negativos ou com baixos títulos. Nas fêmeas nesse estágio da infecção, comumente ocorre a recrudescência da bacteremia e o aumento nos títulos de anticorpos nos períodos de estro, gestação ou abortamento, sendo, portanto adequados para a realização do diagnóstico nesses períodos (CARMICHAEL e GREENE, 1990).

As provas de SAR e SAL são rotineiramente realizadas empregando antígenos de superfície bacteriana e agentes redutores de pontes de enxofre como o 2-mercaptoetanol (2-ME) que reduzem a ocorrência de reações falso-positivas, desnaturando as moléculas IgM que tem uma maior característica de aglutinação não-específica que a molécula de IgG, aumentando conseqüentemente a especificidade da reação (BADAKHSH, 1982; CARMICHAEL e SCHIN, 1996; JOHNSON e WALKER, 1992). A detecção de anticorpos com esse tratamento ocorre, portanto, num período bem mais tardio, por volta das 12 semanas pós-infecção, gerando então resultados falso-negativos na sua fase inicial. No entanto, elevadas porcentagens de reações inespecíficas podem ser observadas, mesmo após o emprego do 2-ME, sendo necessária a confirmação dos resultados positivos (CARMICHAEL e SCHIN, 1996; JOHNSON e WALKER, 1992; MEGID et al., 2000).

As provas de SAR e SAL com 2-ME são consideradas provas de alta sensibilidade e indicadas como provas de triagem relatando-se 99% de correlação entre um resultado negativo e a ausência de infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e SCHIN, 1996; JOHNSON e WALKER, 1992, NICOLETTI e CHASE, 1987).

A SAR é provavelmente o teste sorológico mais comumente utilizado na triagem de cães para a infecção por *B. canis* com vantagens sobre os outros, incluindo alta sensibilidade e precocidade, pois já revela anticorpos a partir de três a quatro semanas da infecção (CARMICHAEL e GREENE, 1990). Além disto, é um teste barato, rápido e de

fácil execução, podendo ser executado em qualquer clínica veterinária (GALPHIN, 1977; CARMICHAEL e SHIN, 1996). A SAR é um excelente teste de triagem, no entanto, devido à ocorrência de reações falso-positivas, não é o teste definitivo, devendo ser confirmado por testes mais específicos (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998). Um resultado negativo na SAR é uma forte evidência de que o cão não esteja infectado, no entanto, apenas 40% dos animais positivos estão realmente infectados (CARMICHAEL, 1998). De acordo com Iribarren et al. (1999), a utilização da *B. canis* M-associada ao tratamento prévio dos soros pelo 2-ME diminui a proporção de resultados falso-positivos para menos de 10% sem perda da sensibilidade.

A SAL é o teste sorológico clássico para o diagnóstico da brucelose canina. É um método semi-quantitativo e muitas vezes é utilizada para a confirmação da SAR-ME (CARMICHAEL, 1998). Permite ainda o monitoramento de títulos de anticorpos, o que é importante no caso de cães em tratamento, em canis na fase de saneamento da infecção ou em programas de controle. Títulos de 50 a 100 indicam suspeita da infecção, sendo considerados positivos no teste animais com títulos iguais ou maiores que 200. A SAL tem muitas das vantagens e desvantagens da SAR, no entanto é menos sensível e um pouco mais específico (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992).

A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) pode ser realizada através de dois métodos, o que utiliza antígenos presentes na parede celular (IDGA-LPS) e o que utiliza antígenos de proteínas citoplasmáticas (IDGA-PC) (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

O IDGA-LPS não é tão facilmente utilizável quanto a SAR ou SAL, pois há maior complexidade para a preparação do antígeno e também para a leitura dos resultados, além de ser considerada uma prova mais específica do que os testes de aglutinação, porém, reações cruzadas com outros microorganismos ainda podem ocorrer. Iribarren et al. (1999) examinaram 1.148 cães de Buenos Aires, Argentina, em um estudo comparativo entre as técnicas de IDGA e SAR, e observaram, para o IDGA, uma sensibilidade de 95,6% e especificidade de 100%.

Através deste teste, os anticorpos podem ser detectados a partir de oito a 12 semanas após a infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998). No entanto, em infecções crônicas, o diagnóstico pela IDGA fica dificultado, pois a partir de quatro meses após o término da bacteremia há redução dos níveis de anticorpos circulantes

(LARSSON et al., 1984b; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

No Brasil, o teste de IDGA tem sido executado com o “kit” produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), no qual o antígeno é constituído por proteínas e lipopolissacarídeos extraídos da *B. ovis*, amostra Reo 198, padronizado por comparação com o antígeno de referência e é empregado na forma liofilizada. A leitura é realizada em 24, 48 e 72 horas após a distribuição dos soros, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo preto e o resultado final é relatado após a leitura de 72 horas (AZEVEDO, 2002)

O IDGA empregando proteína citoplasmática (IDGA-PC) utiliza extrato protéico do citoplasma bacteriano da *B. canis* (variante M-) e apresenta menor proporção de reações cruzadas. Uma das desvantagens das provas baseadas em antígenos internos é a detecção de anticorpos produzidos contra estirpes lisas e rugosas não possibilitando a identificação da espécie responsável pela infecção, devido aos antígenos citoplasmáticos serem comuns, dando reações positivas quando as infecções são causadas por *B. suis*, *B. abortus* e *B. ovis*. Este fato não é de grande interesse clínico, pois infecções por outras brucelas raramente ocorrem em cães (BARR et al., 1986).

Os anticorpos anti-*Brucella canis* são detectados pelo IDGA-PC 12 semanas após a infecção e são detectáveis por 36 meses após o término da bacteremia. Dessa forma, o IDGA-PC pode detectar animais com infecção crônica quando os outros testes são negativos (JOHNSON e WALKER, 1992).

Outro teste empregado para o diagnóstico da brucelose canina é a fixação de complemento, cuja técnica é amplamente utilizada também para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* e *B. abortus* e apresenta sensibilidade e especificidade elevadas. Vem sendo empregado em vários estudos, como na cidade de Belém, estado do Pará, Brasil, onde Molnar et al. (2001), examinaram 236 cães e encontraram 45,37% (107/236) de positividade pela IDGA, 38,56% (91/236) pela fixação de complemento e 46,14% (109/236) através do teste de ELISA indireto.

Vários testes de ELISA vem sendo desenvolvidos no diagnóstico da brucelose canina, empregando não só antígenos de superfície bacteriana ou proteínas citoplasmáticas, como também com o uso de proteínas recombinantes.

O teste de ELISA indireto é altamente específico, entretanto, menos sensível que a SAL para a triagem de cães infectados (CARMICHAEL e GREENE, 1998). A

sensibilidade do ELISA indireto foi melhorada com a utilização de solução salina aquecida (HSS) para a extração do antígeno (variante M-) (MATEU-DE-ANTONIO et al., 1993).

BALDI et al. (1994) extraíram proteínas citoplasmáticas de *B. abortus* a partir de imunoadsorção com anticorpo monoclonal (BC68) e as utilizaram no teste de ELISA indireto, para a detecção de anticorpos humorais em cães com brucelose. De um total de 120 animais, dos quais 17 infectados e positivos ao teste de SAR-ME e 103 cães saudáveis e negativos na SAR-ME, todos os cães infectados e 2% (2/103) dos cães saudáveis apresentaram resposta anti-proteína IgG. Todos os soros positivos no ELISA também foram positivos na SAR-ME.

Já o uso de proteínas recombinantes de *Brucella spp.* como antígenos nos ensaios imunoenzimáticos foram propostos para o diagnóstico da brucelose, tendo em vista a vantagem de apresentar maior eficiência na purificação do antígeno e maior especificidade na detecção da infecção (WANKE, 2002). No entanto, em alguns casos, observou-se uma baixa sensibilidade na detecção de anticorpos específicos.

As proteínas recombinantes Omp31 e Lumazine Synthase (LS) de *Brucella spp.* foram empregadas no sorodiagnóstico da brucelose canina, resultando numa sensibilidade de 87% e 92% respectivamente em cães positivos por métodos bacteriológicos (CASSATARO et al., 2004; WANKE, et al., 2002).

Arese et al. (1999) utilizaram no teste de ELISA a proteína BP26 e obtiveram uma sensibilidade de 98% e especificidade de 97%.

2.11.2. Diagnóstico bacteriológico

O cultivo microbiológico do agente é considerado o método definitivo para o diagnóstico da infecção por *Brucella canis* e tem sido indicado para a confirmação de resultados positivos obtidos nos testes sorológicos de triagem (CARMICHAEL, 1976; MOORE, 1969; SAEGUSA, et al., 1977; FLORES-CASTRO e SEGURA, 1976; LARSSON e COSTA, 1980; UEDA, et al., 1974 a,b). O agente pode ser encontrado em amostras de sangue, urina, secreções vaginais, sêmen, leite e vários tecidos como linfonodos, baço, fígado, medula óssea e órgãos reprodutivos (CURRIER et al., 1982; MOORE e GUPTA, 1970; UEDA et al., 1974 a,b).

Devido à prolongada bacteremia, a hemocultura é o método de escolha para o isolamento da *B. canis* (CARMICHAEL e GREENE, 1990). Mais de 50% dos cães

infectados apresentam uma bacteremia que dura um ou mais anos (CARMICHAEL, 1998). Dentro de duas a quatro semanas após a infecção, as hemoculturas são positivas para *B. canis* e continuam positivas por no mínimo 30 semanas (JOHNSON e WALKER, 1992). As desvantagens da hemocultura são o tempo mínimo de dez dias para a obtenção de resultados e a baixa sensibilidade nas infecções crônicas, isso porque a bacteremia passa a ser intermitente e eventualmente diminui com a infecção crônica. (ZOHA e CARMICHAEL, 1982; JOHNSON e WALKER, 1992). Aos 58 meses de infecção, menos de 25% dos animais infectados apresenta hemocultura positiva (JOHNSON e WALKER, 1992).

A hemocultura negativa não exclui a hipótese de infecção por *B. canis*, especialmente nos casos de infecção crônica, no entanto, a hemocultura positiva confirma o diagnóstico. Devido à localização intracelular em células do sistema mononuclear fagocitário, a bactéria pode ser recuperada a partir de aspirados de medula óssea na ausência de hemocultura positiva (JOHNSON e WALKER, 1992).

Secreções vaginais e tecidos fetais são materiais empregados com sucesso para o isolamento bacteriano no período após o abortamento, por conterem um grande número de microrganismos, os quais são eliminados por várias semanas. Já em outros períodos do ciclo estral, o isolamento a partir de secreções vaginais não apresenta valor como método diagnóstico (CARMICHAEL e GREENE, 1990; CICUTA e MIRANDA, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; MOORE, 1969).

Para machos, o cultivo de sêmen normalmente produz números elevados de organismos de 3 a 11 semanas após a infecção. No entanto, pode ocorrer eliminação intermitente de *B. canis* pelo sêmen, o que pode dificultar o isolamento a partir desse material (MOORE, 1969; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

Os cultivos de epidídimo usualmente são positivos entre 35 e 60 semanas de infecção, no entanto, às 100 semanas da infecção, os cultivos epididimais são negativos. A bactéria pode ser isolada da próstata até 64 semanas após a infecção (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998).

De 8 a no mínimo 30 semanas após a infecção, a *B. canis* é eliminada pela urina. A concentração urinária varia de menos de 10 UFC/mL a 10⁵ UFC/mL de urina (CARMICHAEL e JOUBERT, 1988; CARMICHAEL e GREENE, 1990). Os machos tendem a eliminar mais brucelas pela urina do que as fêmeas, provavelmente devido à proximidade da próstata, ductos deferentes e bexiga nos machos (MOORE e KAKUK,

1969).

Nos animais cronicamente infectados, quando a bacteremia cessa, o cultivo pode ser feito a partir de testículos, próstata, epidídimos, baço, linfonodos e medula óssea (CARMICHAEL e KENNEY, 1970; GOMES et al., 1999; MEGID et al., 2000; VARGAS, 1996).

Quando há uveíte causada por *B. canis*, o isolamento pode ser feito a partir do humor aquoso (RIECKE e RHOADES, 1975; SAEGUSA et al., 1977; JOHNSON e WALKER, 1992). A bactéria também foi isolada de lesões como discoespondilite e osteomielite (HENDERSON et al., 1974; SMEAK et al., 1987; KERWIN et al., 1992).

Apesar deste método permitir a detecção específica do agente etiológico da brucelose, demanda tempo, impõe riscos decorrentes da manipulação, além de ser sujeito a resultados falso-negativos em consequência da contaminação das amostras, interferência de antibioticoterapia e da baixa sensibilidade do método, de acordo com o estágio da infecção (ALTON, et al., 1976 apud KEID, 2006; CARMICHAEL, 1976).

2.11.3. Diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica alternativa ou complementar ao isolamento, capaz de detectar um segmento de DNA específico em materiais suspeitos. Desde 1987 vem sendo empregada como instrumento para o aprimoramento do diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e no homem, por apresentar-se mais sensível que os métodos bacteriológicos e mais específica que as técnicas sorológicas atualmente utilizadas no diagnóstico da doença. Considerando sua rapidez de execução em relação ao cultivo bacteriológico, a PCR tem sido uma alternativa promissora ao diagnóstico direto de organismos de crescimento lento e fastidioso (BRICKER, 2002; DAHOUK et al., 2003).

Foi empregada com sucesso para a detecção de *Brucella* em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras, como sangue, soro, sêmen, swab vaginal, órgãos e ainda urina, fluido sinovial, fluido cerebrospinal e material purulento (ELFAKI, et al., 2005b; KEID, 2001; COLMENERO, 2002; CORTEZ et al., 2001; RICHTZENHAIN, et al., 2002).

Embora seja um método de diagnóstico muito vantajoso pela sua rapidez e alta sensibilidade e especificidade, possui também desvantagens que são o alto custo,

principalmente de reagentes e equipamentos, e os fatores inibidores da amplificação do ácido nucléico como: proteínas séricas, debris celulares somáticos, polissacárides e outros componentes dos fluidos corpóreos (BRICKER, 2002; DAHOUK et al., 2003; WILSON, 1997).

Segundo Vieira (2004) os primeiros ensaios empregando a PCR para o diagnóstico da brucelose utilizaram-se de *primers* gênero-específicos capazes de identificar indistintamente as espécies conhecidas do gênero *Brucella*.

Fekete et al. (1990) realizaram a primeira PCR gênero-específica para a detecção de *Brucella* spp. em que um fragmento de 635 pares de bases (pb) do gene codificador de uma proteína de membrana de 43 kilodaltons (kDa) foi amplificado a partir de uma amostra contendo até 0,1 picogramas (pg) de DNA de *Brucella*.

Empregando o mesmo par de *primer* em uma PCR aplicada sobre amostras de abortamento bovino, Fekete et al (1992) encontraram um limiar de detecção de cinco células de *Brucella*/100 mg de tecido. Das amostras que foram testadas 55 foram positivas tanto para a PCR quanto para o cultivo bacteriológico e, de 52 amostras negativas pelo isolamento bacteriano, duas ainda apresentaram resultado positivo na PCR.

Diversos outros *primers* específicos para detecção de DNA do gênero *Brucella* foram descritos na literatura, sendo que os *primers* B4 e B5 foram os mais amplamente utilizados para o diagnóstico da brucelose em diversos tipos de amostras e hospedeiros (COLMENERO et al, 2002; ELFAKI et al, 2005b; KEID, 2001, RICHTZENHAIN et al, 2002). Desenhados por Baily et al (1992), os *primers* amplificam um fragmento de 233 pb a partir do gene codificador da proteína periplásmica imunogênica denominada BCSP31 e com uma massa molecular de 31 kDa, esse gene é conservado em todas as espécies do gênero *Brucella*. Posteriormente, verificou-se que apesar da ampla utilização e sensibilidade diagnóstica os *primers* B4 e B5 amplificam também o DNA proveniente da bactéria *Ocrhobactrum* spp.. Mas apesar de apresentar elevada similaridade de sequências gênicas com as bactérias do gênero *Brucella*, as infecções por *Ocrhobactrum* não são consideradas clinicamente relevantes em humanos além de a prevalência em cães ser desconhecida (CASANAS et al., 2001; VELASCO, et al., 1998).

A PCR utilizando esses *primers* no diagnóstico da brucelose canina em amostras de trato reprodutivo com um protocolo de extração de ácidos nucléicos baseado na utilização do isotiacianato de guanidina apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 64,2% e 91,4% respectivamente em relação à hemocultura (KEID, 2001).

2.12. Tratamento

Como ocorre em infecções causadas por microrganismo intracelulares, o tratamento para a brucelose canina, frequentemente é mal sucedido. Em virtude da possibilidade de falhas e do alto custo, em geral recomenda-se o sacrifício dos cães infectados, principalmente quando se trata de animais de canis, uma vez que continuam sendo fontes de infecção para outros animais e para seres humanos, exceto quando houver fortes razões para ser tentado o tratamento, principalmente nos animais de alto valor zootécnico. Entretanto, a decisão de tratar ou não o animal deve ser baseada numa conversa entre o proprietário e o veterinário (CARMICHAEL e GREENE, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; JENNINGS et al., 1974).

Geralmente há um declínio da bacteremia e dos títulos de anticorpos séricos com o início da antibioticoterapia, que não significa a erradicação da infecção. Há muitos casos de a fase de bacteremia não retornar, porém o microrganismo persiste em determinados órgãos. Os animais voltam a apresentar elevação dos títulos de anticorpos e/ou o agente é recuperado de amostras de tecidos depois de descontinuado o tratamento. (CARMICHAEL e GREENE, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992; MOORE, 1969).

A realização de antibioticoterapia na gestação de cadelas infectadas pode reduzir as chances de abortamentos, no entanto, as fêmeas podem permanecer em bacteremia e soropositivas uma vez que o tratamento é suspenso, o que pode resultar no nascimento de filhotes doentes (JOHNSON et al., 1982; CARMICHAEL e GREENE, 1990; MOORE, 1969).

Diversos regimes de tratamento utilizando tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfonamidas, eritromicina, ampicilina e outros agentes antimicrobianos têm sido utilizados para o tratamento da brucelose canina, porém, o agente é raramente eliminado se não houver uma combinação adequada de drogas, pois a utilização de um único antibiótico não é suficiente para eliminar a bactéria. Atualmente, o esquema de tratamento mais bem sucedido é a combinação de minociclina via oral na dose de 25 mg/Kg/dia, durante duas semanas e diidroestreptomicina intramuscular na dose de 5 mg/Kg a cada 12 horas, durante uma semana (JOHNSON e WALKER, 1992).

Carmichael e Greene (1998) sugeriram o emprego de hidrocloreto de minociclina (12 mg/kg, IM, três vezes ao dia, por pelo menos duas semanas) juntamente com estreptomicina (10 mg/kg, IM, três vezes ao dia, durante a primeira semana),

entretanto, devido ao alto custo da minociclina, utiliza-se a doxiciclina.

Trabalhos mais recentes como o de Wanke et al. (2006) que utilizaram somente enrofloxacina oral na dose de 5mg/kg a cada doze horas por 30 dias em machos e fêmeas, inclusive algumas em gestação, constataram que após 14 meses do começo do estudo os animais foram soronegativos na SAR, nenhum aborto foi observado, todos os filhotes nasceram saudáveis e o cultivo das descargas vaginais pós-parto foram negativos, entretanto, este fármaco não foi totalmente eficaz já que houve a recorrência de abortos, transmissão da doença aos filhotes e disseminação do agente durante o parto. Sugere-se então que a enrofloxacina pode ser uma alternativa ao tratamento da brucelose canina desde que ocorra a associação com outras drogas.

Testes sorológicos e bacteriológicos devem ser realizados nos animais durante pelo menos seis meses após o término da antibioticoterapia, a fim de garantir o sucesso do tratamento que deve ser mantido até que se obtenha um resultado negativo na sorologia, caso contrário, é considerado ineficaz (CARMICHAEL e GREENE, 1990).

2.13. Controle e Prevenção

Em canis comerciais, o controle e a profilaxia da infecção envolvem procedimentos como a confirmação através de testes sorológicos e bacteriológicos, identificação e eliminação dos animais infectados, quarentena, e principalmente a implantação de certas práticas para a prevenção de surtos futuros (JONES e EMERSON, 1984; JOHNSON e WALKER, 1992; MOORE, 1969; PICKERILL e CARMICHAEL, 1972).

A prevenção da infecção é particularmente importante nos canis comerciais, pois uma vez introduzida numa população confinada, sua disseminação se dá de forma rápida, acometendo um grande número de animais (SPINK, 1970). E pelo fato de não haver vacina contra a *Brucella canis*, a identificação e eliminação de animais infectados é o único método seguro para a erradicação da doença nessas populações (PICKERILL e CARMICHAEL, 1972; JOHNSON e WALKER, 1992). Vale salientar que esses animais devem ser removidos do canil, uma vez que somente a separação de cães sadios e infectados no mesmo canil parece não ser suficiente para evitar a propagação da infecção, mesmo empregando-se medidas rígidas de higiene (CARMICHAEL e KENNEY, 1970; CARMICHAEL e JOUBERT, 1988; MOORE, 1969; PICKERILL, 1970; SPINK, 1970).

Animais com histórico de problemas reprodutivos devem ser isolados, realizados a

sorologia e isolamento do agente e, se o diagnóstico for confirmado, a sorologia é realizada em todos os animais do plantel. Os animais suspeitos são novamente testados após 30 dias, e os positivos devem ser eliminados. O movimento dos animais dentro da colônia deve ser restrito, com intuito de prevenir exposições adicionais enquanto as fontes de infecção e as vias de transmissão estão sendo investigadas (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON e WALKER, 1992).

Todas as vias de transmissão possíveis devem ser consideradas (CARMICHAEL, 1998). Devido ao fato da descarga vaginal pós-abortamento, material de abortamento, sêmen de machos recentemente infectados e urina de machos conterem um grande número de bactérias, esses materiais devem ser primeiramente avaliados como possíveis vias de eliminação. Aerossóis infectantes, fômites, transmissão venérea e infecção congênita também devem ser considerados (JOHNSON e WALKER, 1992).

Animais utilizados para reprodução devem ser retestados a cada três ou quatro meses pós-cobertura e os que saem do plantel para cruzar só devem ser readmitidos após quarentena e sorologia negativa (CARMICHAEL e GREENE, 1990). Os animais que serão introduzidos no plantel devem possuir duas sorologias negativas com intervalo de 30 dias (JONES e EMERSON, 1984; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL, 1998). Portanto, machos e fêmeas, diagnosticados como positivos devem ser afastados dos programas de reprodução e a higienização das instalações ser executada rigorosamente (CARMICHAEL e GREENE, 1990).

Os tratadores de animais podem ser uma fonte de manutenção da infecção e como a vida do agente é muito curta fora do hospedeiro, a utilização de desinfetantes como amônia quaternária, hipoclorito sódio a 2.5%, soda caustica 2-3%, formaldeído a 2% e iodóforos tem-se mostrado efetivos para a desinfecção das instalações e equipamentos (CARMICHAEL e GREENE, 1990). Como a principal via de contaminação dos seres humanos é o contato com descargas vaginais, material de aborto, ou durante o acasalamento com animais infectados, todas as pessoas que entrarem em contato com os animais suspeitos ou infectados devem desinfetar suas mãos e áreas contaminadas (CARMICHAEL, 1990).

Surtos futuros de brucelose por *B. canis* são evitados através da prevenção de exposição. Isso é reforçado pela quarentena de todos os animais adquiridos, até que testes mensais durante oito a 12 semanas indiquem resultados negativos. Animais que forem expostos ao agente e animais com qualquer sinal clínico da infecção por *B. canis* não

devem ser considerados, sob qualquer circunstância, para aquisição por um canil (JOHNSON e WALKER, 1992).

Em algumas situações, os proprietários recusam a eliminação dos animais e, nesses casos há a indicação da castração concomitantemente à terapia com antimicrobianos, isolamento dos animais, cuidados especiais de higiene e manejo adequado, além de acompanhamento dos casos em pelo menos 3 meses, devendo-se sempre informar aos donos dos animais sobre a ineficácia do tratamento e a manutenção de seu animal como fonte de infecção.

Medidas importantes em relação à transmissão aos seres humanos são os cuidados de higiene e medidas de biossegurança para limitar os riscos de exposição de algumas atividades ocupacionais como laboratoristas e indivíduos que trabalham em canis.

Pouco se tem feito para controlar a brucelose canina de uma forma sistematizada no país, a não ser em alguns canis comerciais. Assim, muitos casos de infecção por *B. canis* não são relatados, principalmente por não ser exigida notificação obrigatória pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Desta forma, a vigilância deve ser realizada por todos os clínicos de pequenos animais e proprietários de cães e canis para se impedir que a doença acometa e se propague entre esses animais. Todos os animais destinados à reprodução devem ser livres da doença para se evitar sua disseminação, e todas as suspeitas de brucelose canina devem ser confirmadas para que se possa controlar essa doença (MINHARRO et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados cães que passaram pelo atendimento da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos, Paraíba, do Centro Médico Veterinário Dr. Leonardo Torres, bem como através de visitas aos bairros da cidade para assegurar uma maior cobertura de coletas, e foram selecionados de acordo com o consentimento dos proprietários além da condição corporal em que se encontravam.

3.2. Caracterização da área

O município de Patos está situado a uma distância de aproximadamente 300 km da capital do Estado, com área de 513 Km², população de 97.276 (noventa e sete mil, duzentos e setenta e seis) habitantes, temperatura média de 32°C, umidade relativa média do ar de 55%, precipitação pluviométrica média anual de 700 mm, e altitude média de 242 m, acima do nível do mar (IBGE, 2007).

3.3. Amostragem

Para o cálculo do número de animais a serem utilizados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de animais a serem utilizados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95% → $Z = 1,96$

$P =$ prevalência esperada $\rightarrow P = 10\%$

$d =$ erro absoluto $\rightarrow d = 10\%$

Com base nesses parâmetros, o número de animais a serem amostrados foi de 35, no entanto, por motivos de segurança, foram utilizados 193 cães.

3.4. Colheitas de sangue

As colheitas de sangue foram efetuadas por punção na veia cefálica ou veia jugular externa utilizando-se, dependendo do animal, seringas descartáveis de 3 ou 5 mL, excluindo-se apenas animais com menos de três meses de idade.

As amostras foram colocadas em tubos de vidro identificados e mantidas sobre refrigeração até a chegada ao Laboratório de Doenças Transmissíveis da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba.

Foram então centrifugadas para a obtenção do soro e estocadas a -20°C para posterior realização do diagnóstico sorológico da infecção.

3.5. Questionário epidemiológico

Os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico que foi elaborado de modo a fornecer dados com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que pudessem atuar como possíveis fatores de risco para a brucelose canina (Anexo).

3.6. Diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella canis*

Foram utilizados “kits” produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) (Figura 4). A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante.

Como primeiro passo, o tampão borato foi preparado a partir de 0,03M de Ácido Bórico (H_3BO_3), 0,1M de Cloreto de Potássio (KCl), sendo o pH ajustado em 8,3 com

Hidróxido de Sódio (NaOH) 2M. Em seguida, o gel de ágar foi feito com 1,2% de Ágar Noble, 100 mL de tampão borato e 0,26M de Cloreto de Sódio (NaCl).

Foi adicionado 1 mL de azida sódica (NaN_3) a 1% para a conservação do gel, evitando assim a formação de bolores. Após completa dissolução pelo calor, foram distribuídos 4,5 mL do gel em lâminas de vidro sem ranhuras, permanecendo em temperatura ambiente até sua solidificação. Logo em seguida, as lâminas foram armazenadas a 4°C por 30 minutos. No momento do uso, o gel foi perfurado com moldes de 6 mm de diâmetro e 2,5 mm de distância entre as bordas (Figura 5), sendo um orifício central e seis dispostos ao redor deste, cada orifício com capacidade de 50 μL . Após a retirada do ágar, os poços foram preenchidos com soros controles positivos, soros testes e antígeno (Figura 6). As lâminas permaneceram mantidas em câmara úmida em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo escuro. O resultado considerado foi o da leitura de 72 horas.

Para a interpretação dos exames, levou-se em consideração a formação de uma linha de precipitação entre o soro teste e o antígeno, classificando as amostras em positivas ou negativas. O soro cuja linha de precipitação apresentou identidade com a linha formada pelo soro padrão foi considerado positivo. Caso contrário, quando não houve formação de linha de precipitação ou a linha formada não apresentou identidade com a do soro padrão, a amostra foi considerada negativa.



Figura 4 - Kit para a realização de IDGA. 1 - antígeno, 2 - diluente e 3 - soro controle positivo.



Figura 5 - Perfuração do gel de Agar.

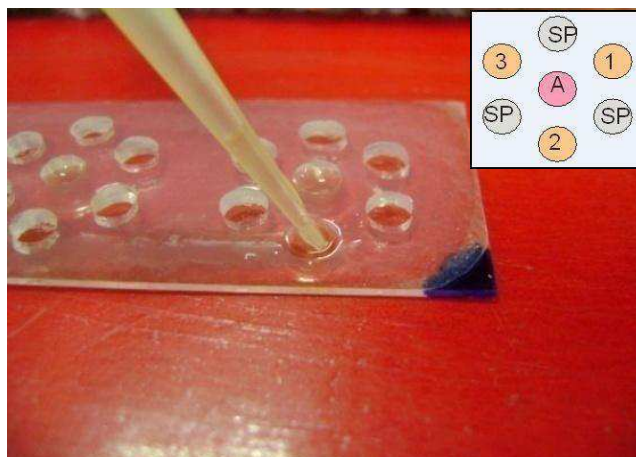


Figura 6 - Distribuição dos soros no gel de Agar e disposição dos outros reagentes. 1, 2, 3 - soros a testar, A - antígeno e SP - soro controle positivo.

3.7. Análise de fatores de risco associados à soropositividade para *Brucella canis*

A análise de possíveis fatores de risco associados à soropositividade para *Brucella canis* foi efetuada com os dados coletados com os questionários epidemiológicos aplicados aos proprietários. As variáveis independentes (possíveis fatores de risco) foram categorizadas e codificadas, deixando-se a categoria de menor risco com o menor código (LATORRE, 2004). Esta categoria de menor risco foi considerada a referência para a comparação com as demais categorias.

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, foram formados dois grupos de animais – soropositivos e soronegativos – que foram comparados frente às variáveis analisadas. Aquelas variáveis que apresentaram um valor de $p \leq 0,2$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999) foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER e LEMESHOW, 2000). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 for Windows.

3.8. Confeccção do mapa georreferenciado

As coordenadas geográficas das residências dos proprietários dos cães foram obtidas com um aparelho de GPS (*Global Position System*). Estas coordenadas, juntamente

com os limites geográficos do município de Patos foram plotados em um mapa georreferenciado digital, baseado no mapa da malha municipal do Brasil de 2001, obtido junto ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). As atividades de plotagem e tratamento do mapa digital foram realizadas com o programa ArcGIS versão 9.1.

3.9. Cultivo e isolamento de *Brucella canis*

Após os resultados da sorologia, os animais que apresentaram resultado positivo foram localizados e foi procedida colheita de sangue com anticoagulante e medula óssea por punção da crista ilíaca para a realização de cultivo em ágar-*Brucella*¹ (Figura 7) enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado, após manutenção por três dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e Tioglicolato de sódio, incubados em estufa a 37°C.

Provas bioquímicas como catalase, motilidade, utilização do citrato, crescimento no meio de cultura Mac Conkey, produção de H₂S, produção de urease e redução de nitrato também foram realizadas para a identificação da bactéria.

O isolamento e identificação bacteriana foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido e no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do CSTR/UFCG.

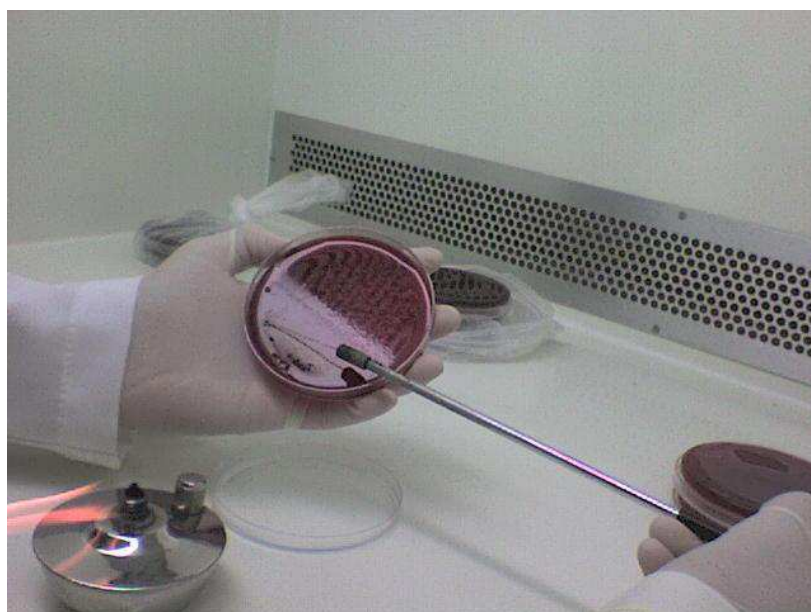


Figura 7 - Cultivo das amostras em ágar-*Brucella* com 5% de sangue ovino.

¹ Difco

3.9.1. Confirmação das estirpes isoladas

Para a confirmação das bactérias isoladas, foi realizada a PCR gênero-específica no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo. As bactérias isoladas tiveram seu DNA extraído pela técnica da fervura, segundo Nishimura et al. (1996) e On et al. (2001). Uma suspensão de $2,3 \times 10^9$ bactérias/mL composta por 1000 μ L de água ultrapura (Milli-Q®), correspondente à escala 8 de MacFarland, foi aquecida por 10 min a 99°C, para posterior utilização na PCR. O DNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação.

Para a reação foram utilizados os *primers* B4 (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') e B5 (3'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-5') os quais amplificam uma sequência de 233 pb do gene que codifica a proteína periplásmica imunogênica BCSP31 específica para *Brucella* spp.

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500 μ l com volume final de 50 μ l, segundo Sambrook et al. (1989) e Baily et al.(1992).

No ciclo empregado (Termociclador), inicialmente as amostras foram submetidas a uma desnaturação de 94°C por 5 minutos e a seguir empregados 40 ciclos de amplificação divididos em quatro fases: 1 - Desnaturação – 94°C /60 segundos, 2 - Anelamento – 60°C /60 segundos, 3 - Extensão – 72°C /60 segundos e 4 - Extensão final – 72°C/10 minutos.

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045M TRIS-Borato e 1mM de EDTA, pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100 pb.

O gel foi corado por brometo de etídeo 0,5 μ g/ml e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 193 soros analisados pela prova da IDGA, seis amostras apresentaram reação positiva (Figura 8), cuja linha de precipitação apresentou identidade com a linha formada pelo soro padrão (Figura 9), correspondendo a uma prevalência de 3,11% (IC 95% = 1,15% – 6,64%). A distribuição geográfica das residências dos animais é apresentada na Figura 10, onde se observa uma maior concentração de cães da zona urbana.

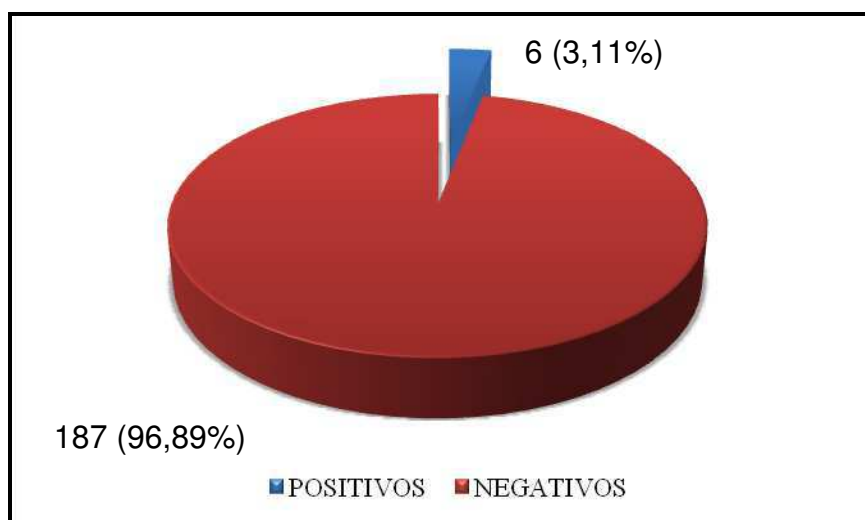


Figura 8 - Resultado da técnica de IDGA aplicada à brucelose por *Brucella canis* em 193 cães do município de Patos, Paraíba

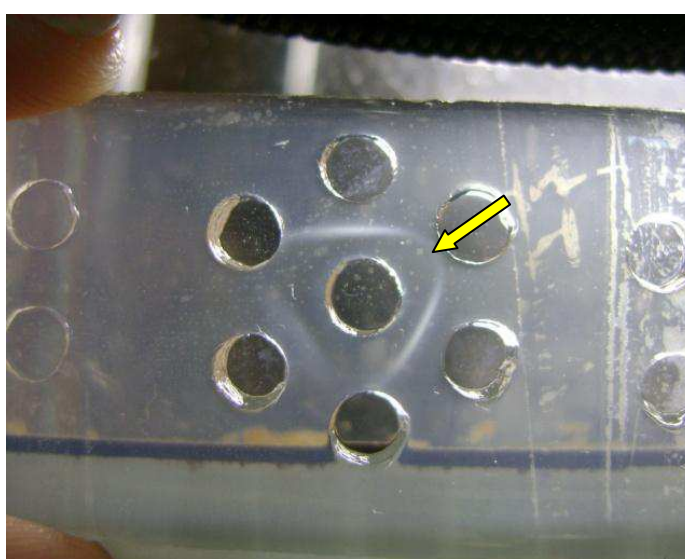


Figura 9 - Reação positiva na IDGA para brucelose (seta).

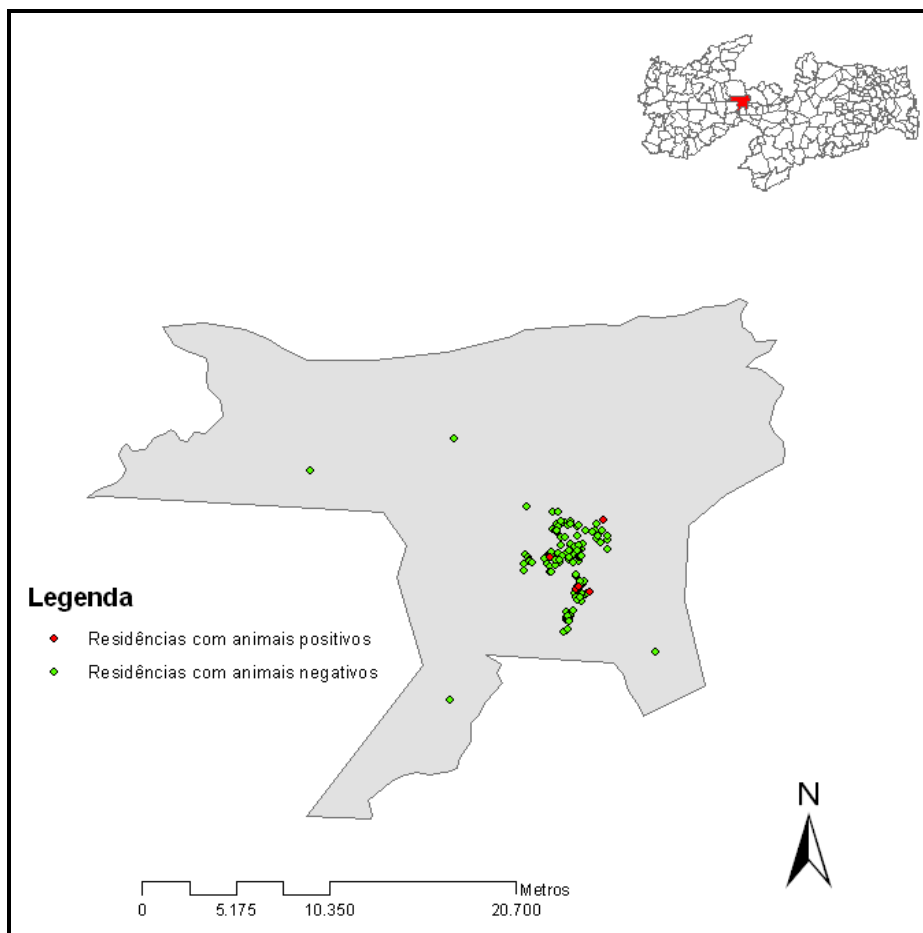


Figura 10 - Mapa do município de Patos demonstrando a localização geográfica das residências dos cães soropositivos e soronegativos. Detalhe ilustrando a localização do município de Patos no Estado da Paraíba.

Esse percentual de positividade foi inferior aos resultados obtidos por Vargas et al. (1996) em Santa Maria, RS, Megid et al. (1999) em Botucatu, SP, Nárez et al. (1999) na cidade do México, e Poester et al. (1994) em Uruguaiana, RS, que obtiveram 72,7%, 57,1%, 45% e 7,4% de positividade, respectivamente. Estes resultados, no entanto, podem ser explicados pelo fato desses estudos terem sido realizados em canis comerciais que possuíam um histórico de infertilidade, abortamentos e casos de natimortos, sendo um ambiente altamente favorável para a difusão da infecção, some-se a isso condições de confinamento dos animais, que também favorece a transmissão da bactéria, pelo fato de haver um contato íntimo de animais doentes e sadios, levando à infecção desses últimos. No presente trabalho, foi examinada uma amostra de animais que não apresentava histórico de problemas reprodutivos que poderiam ser sugestivos de brucelose canina e que não pertenciam a canis comerciais.

Resultados superiores também foram encontrados por Miranda et al. (1986), na província de Formosa, Argentina, Melo et al. (1997/98), no distrito de Monte Gordo, Camaçari, BA, Iribarren et al. (1999), em Buenos Aires, Argentina, Maia et al. (1999), nas cidades do Rio de Janeiro, RJ e Niterói, RJ, Keid (2001), em São Paulo, SP, e Molnar et al. (2001), em Belém, PA. Essas diferenças podem ser explicadas por fatores espaciais e temporais, bem como pela presença de animais na fase abacterêmica da infecção, onde os níveis de anticorpos circulantes declinam (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998; DZIEZYC, 2000) ou em início de infecção, onde os anticorpos podem ainda não ser detectados pela IDGA (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL e GREENE, 1998), e ainda pela ocorrência de reações cruzadas com outros microorganismos como *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram negativas (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL e GREENE, 1998). Vale salientar que a prevalência de *B. canis* é variável segundo a região, a população estudada e o método de diagnóstico empregado.

Côrtes et al. (1988) examinaram 3.386 cães errantes capturados pelo programa de controle de reservatórios de zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria de Higiene e Saúde do Município de São Paulo, durante o período de 1981 a 1985, e encontraram 7,5% de positividade, o que foi superior ao percentual encontrado no presente trabalho. Nesse estudo, foi empregado como teste diagnóstico a imunodifusão em gel de ágar com antígeno produzido pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CPZ).

López et al. (2009) em Lomas de Zamora, província de Buenos Aires, examinaram 224 cães onde 33 foram positivos pelo RSAT resultando numa prevalência de 14,7%, e 24 (10,7%) foram confirmados pelo teste de ELISA indireto. Dos 33 positivos na RSAT foram realizadas 17 hemoculturas onde foi isolada *B. canis* de 2 casos.

Frequências próximas a encontrada no presente trabalho foram obtidas por Alves et al. (1999), que utilizaram a técnica de IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *B. canis*, na cidade de Patos, PB, constataram 3,6% (8/221) de positividade em cães submetidos à campanha anual de vacinação anti-rábica, e por Azevedo et al. (2003), ao examinarem 410 cães em Santana de Parnaíba, SP, provenientes da campanha de vacinação anti-rábica de 1999, encontraram uma soroprevalência de 2,2%.

Na análise de fatores de risco para a infecção por *B. canis*, foram selecionadas, na análise univariada, as variáveis limpeza do ambiente dos cães e passear com os mesmos (Tabela 2). O fator de risco identificado na análise multivariada por regressão logística

múltipla foi não realizar limpeza no ambiente dos animais (*odds ratio* = 7,91; IC 95% = 1,50 – 41,72; $p = 0,015$) (Tabela 3). O fato do proprietário não realizar a limpeza do ambiente onde o animal permanece foi apontado como fator de risco para a infecção por *Brucella canis*, o que é plausível do ponto de vista biológico, uma vez que a limpeza rotineira do ambiente com detergentes comuns reduz o número de bactérias eliminadas por cães infectados, principalmente no caso de parto ou abortamento. Portanto, sugere-se que tal prática seja adotada com frequência com o objetivo de evitar a exposição de outros animais ao risco de infecção.

Tabela 2 – Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para *Brucella canis* em 193 cães do município de Patos, Paraíba.

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	P
Grau de escolaridade do proprietário	Analfabeto	2	0 (0,0%)	0,633
	1º Grau incompleto	64	4 (6,3%)	
	1º Grau completo	18	0 (0,0%)	
	2º Grau incompleto	24	0 (0,0%)	
	2º Grau completo	43	1 (2,3%)	
	3º Grau incompleto	19	0 (0,0%)	
	3º Grau completo	23	1 (4,3%)	
Sexo dos animais	Macho	110	4 (3,6%)	0,701
	Fêmea	83	2 (2,4%)	
Idade dos animais	3 – 6 meses	14	0 (0,0%)	0,486
	> 6 – 12 meses	46	2 (4,3%)	
	>12 – 24 meses	44	2 (4,5%)	
	>24 – 48 meses	31	0 (0,0%)	
	>48 – 72 meses	30	0 (0,0%)	
	> 72 meses	28	2 (7,1%)	
Raça	Sem raça definida	110	3 (2,7%)	1,000
	Com raça definida	83	3 (3,6%)	
Tipo de manejo	Domiciliar	140	5 (3,6%)	0,430
	Semi-domiciliar	36	0 (0,0%)	
	Solto	17	1 (5,9%)	
Alimentação	Ração comercial	38	1 (2,6%)	0,745
	Preparado em casa	24	1 (4,2%)	
	Restos de comida	53	3 (5,7%)	
	Ração + Preparado	33	1 (3,0%)	
	Ração + Restos	40	0 (0,0%)	
	Preparado + Restos	5	0 (0,0%)	

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	P
Contato com cães	Não	93	4 (4,3%)	0,431
	Sim	100	2 (2,0%)	
Contato com animais silvestres	Não	181	6 (3,3%)	1,000
	Sim	12	0 (0,0%)	
Ambiente dos cães	Terra	66	3 (4,5%)	0,871
	Cimento	86	2 (2,3%)	
	Terra/Cimento	40	1 (2,5%)	
	Terra + Cimento	1	0 (0,0%)	
Limpeza do ambiente dos cães	Não	24	3 (12,5%)	0,026*
	Sim	169	3 (1,8%)	
Destino do aborto	Não faz nada	189	6 (3,2%)	1,000
	Joga no lixo	4	0 (0,0%)	
Vacinação dos animais	Não	39	2 (5,1%)	0,350
	Sim	154	4 (2,6%)	
Passear com os animais	Não	72	4 (5,6%)	0,198*
	Sim	121	2 (1,7%)	
Leva os animais quando viaja	Não	166	6 (3,6%)	0,598
	Sim	27	0 (0,0%)	

* Variáveis selecionadas para a análise multivariada

Tabela 3 - Resultado da análise de regressão logística múltipla para os fatores de risco associados com a soropositividade para *Brucella canis* em 193 cães do município de Patos, Paraíba.

Fator de risco	Odds ratio	IC 95%	P
Não realizar limpeza do ambiente	7,91	[1,50 – 41,72]	0,015

Neste estudo, outros fatores embora não identificados como de risco para a infecção por *B. canis* merecem ser destacados.

Observando inicialmente o grau de escolaridade dos proprietários, verifica-se que 66,67% dos animais soropositivos pertenciam a pessoas de condições financeiras limitadas o que reflete no maior caso de positivos provenientes do Hospital Veterinário e das coletas

realizadas nos bairros como o Jatobá, uma vez que o mesmo é o bairro mais populoso além do nível econômico de seus moradores ser baixo.

Analisando-se o sexo como um possível fator de risco associado à soropositividade para *B. canis*, não foi observada significância estatística, ou seja, não houve predisposição de sexo, estando os machos e as fêmeas igualmente expostos ao risco da infecção. Resultados semelhantes foram encontrados por Hubbert et al. (1980), Germano et al. (1987), Moraes et al. (2002), Azevedo et al. (2003) e Vasconcelos et al. (2008).

Já no que concerne à idade, foi observado que 68,9 % dos animais positivos tinham mais de um ano de idade. Resultados similares também foram obtidos por Hubbert et al. (1980), Germano et al. (1987), Moraes et al. (2002), e Azevedo et al. (2003) que encontraram uma maior proporção de resultados positivos em animais com idade superior a um ano. Isso pode ser justificado pela maturidade sexual e conseqüente cobertura, bem como pela maior possibilidade de contato com animais infectados em função da idade (JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL e GREENE, 1998). Quando a faixa etária foi analisada como possível fator de risco associado à soropositividade para *B. canis*, não foi observada significância estatística.

Quanto ao cultivo microbiológico, foi isolada uma bactéria com características morfotintoriais semelhantes à *B. canis* da medula óssea de um animal, conforme demonstrado por Johnson e Walker (1992) e obtido por Ueda et al. (1974b). Isto se deve ao fato de que apesar de o sangue ser considerado o material de eleição para o isolamento pelo longo período de bacteremia, a *B. canis* também localiza-se em outros órgãos linfóides podendo então ser recuperada através de aspirados de medula óssea na ausência de hemoculturas positivas.

A bactéria cresceu bem em meio ágar-*Brucella* enriquecido com 5% de sangue ovino, no qual foram observadas colônias pequenas, não hemolíticas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos (Figura 11).

A coloração de Gram revelou cocobacilos Gram-negativos. Os resultados dos testes bioquímicos estão apresentados na Tabela 4 e condizem com os obtidos quando da realização de provas bioquímicas no primeiro caso de isolamento de *B. canis* no Brasil em Minas Gerais por Godoy et al. (1977), bem como por Gomes et al. (1999) no Rio Grande do Sul, e Larsson e Costa (1980) em São Paulo, com exceção da não produção de urease.

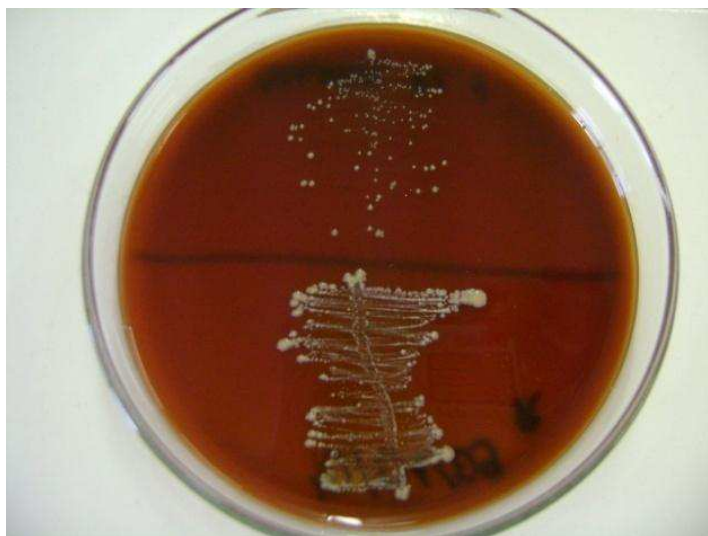


Figura 11 - Colônias bacterianas cultivadas em ágar-*Brucella*, isoladas de medula óssea de cão.

Tabela 4 – Provas bioquímicas utilizadas para identificação das amostras isoladas da medula óssea de um cão soropositivo para *Brucella canis*.

PROVA BIOQUÍMICA	RESULTADO
Catalase	+
Motilidade	-
Citrato	-
Crescimento no meio de cultura Mac Conkey	-
Produção de H ₂ S	-
Redução de nitrato	+
Produção de uréase	-

Vários trabalhos de isolamento de *B. canis* constataram algumas variações quando realizada a identificação da bactéria pelas características bioquímicas, como Flores-Castro et al. (1977) na Cidade do México, que obteve amostras que não reduziram nitrato e apresentaram variações no crescimento em fucsina básica, mesmo assim, reproduziram a doença quando inocularam as estirpes isoladas em outros cães. Larsson e Costa (1980) ao examinarem 27 cães, obtiveram 5 soropositivos e destes, 3 apresentaram hemoculturas positivas. Quando submetidas à identificação, as estirpes apresentaram produção de H₂S, fato esse também observado por Riecke e Rhoades (1975), além de crescimento lento na presença de fucsina básica conforme Swenson et al. (1972).

A partir da amostra isolada foi extraído DNA utilizando *primers* gênero-específicos para *Brucella* spp. (Figura 12), confirmando a infecção por *B. canis*, o que reforça a associação de métodos diretos e indiretos para o diagnóstico da doença juntamente com os resultados da resposta do agente à identificação bioquímica bem como as evidências epidemiológicas.

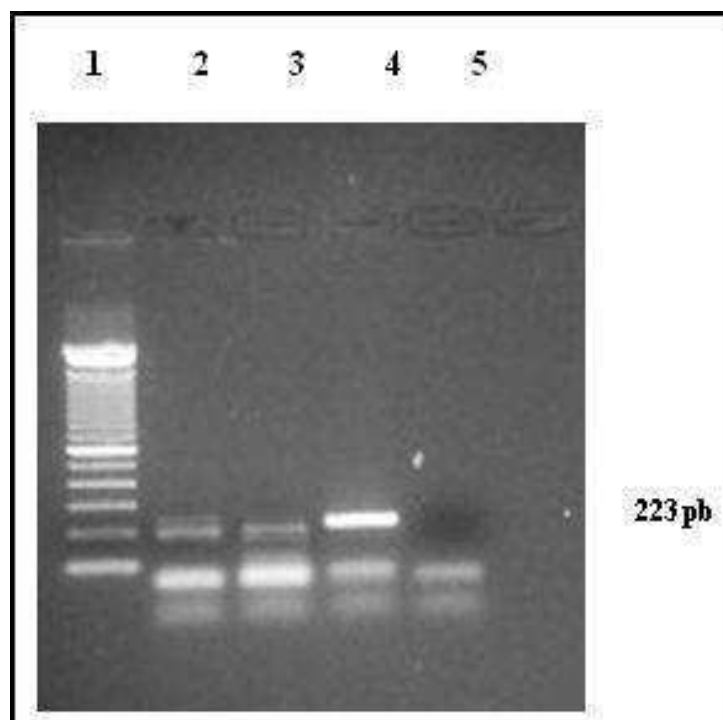


Figura 12 - Resultados da amplificação por PCR para detecção de *Brucella* spp.: 1- Marcador de peso molecular (DNA 100 pb *Ladder* - Invitrogen), 2 e 3- Amostra isolada, 4-Controle positivo (*Brucella abortus* - ATCC 544), 5-Controle negativo (água).

O presente trabalho é o primeiro a relatar o isolamento de *Brucella canis* de cães no Nordeste brasileiro, o que foi confirmado pela PCR. Esse fato apresenta grande relevância para a epidemiologia da doença, uma vez que constatada a exposição ao agente, representa riscos à população humana.

5. CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos com esse estudo, é possível concluir que, a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* no município de Patos foi de 3,11% (IC 95% = 1,15% – 6,64%) indicando a presença da enfermidade e risco de exposição da população, uma vez que houve o isolamento da bactéria, sendo este o primeiro no Nordeste brasileiro.

Sugere-se que a limpeza rotineira do ambiente onde os cães permanecem seja adotada com frequência com o objetivo de evitar a exposição de outros animais ao risco de infecção e que a associação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico são fundamentais para a detecção da doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. C.; MENESES, A. M.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; LOIOLA, C. F.; MARINOVICK, C.; PEREIRA, P. A. S. Soroprevalência de brucelose canina na cidade de Alfenas, MG. Dados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 358-360, 2001.
- ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F.; 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.
- ALVES, F. A. L.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, J. S. L.; SANTOS, F. A. S. Prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães na cidade de Patos-PB. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4., 1999, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1999. p. 259-260.
- ALVES, C. J.; ALVES, F. A. L.; GOMES, A. A. B.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, J. S. L.; SANTOS, F. A. Aspectos epidemiológicos de *Brucella canis* em Patos, Paraíba, Brasil. **Ciência Animal**, v.13, n. 1, p. 45-49, 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. 99f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P. S.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. 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, p. 156-160, 2003.
- BADAKHSH, F. F.; CARMICHAEL, L. E.; DOUGLASS, J. A. Improved Rapid Slide Agglutination Test for Presumptive Diagnosis of Canine Brucellosis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 286-289, 1982.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S. SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271-275, 1992.
- BALDI, P. C.; WANKE, M. M.; LOZA, M. E.; FOSSATI, C. A. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 41, n. 1-2, p. 127-134, 1994.
- BALDI, P. C.; WANKE, M. M.; LOZA, M. E.; MONACHESI, N.; FOSSATI, C. A. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 2-3, p. 273-281, 1997.

BARR, S. C.; EILTS, B. E.; ROY, A. F.; MILLER, R. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 6, p. 686-687, 1986.

BARG, L. GODOY, A. M.; PERES, J. N. Pesquisa de aglutininas anti-*Brucella canis* em soros humanos. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 29, n. 1, p. 31-34, 1977.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. São Paulo: Edições Melhoramentos, p. 591-600, 1990.

BLANKENSHIP, R. M.; SANFORD, J. P. *Brucella canis*: a cause of undulant fever. **American Journal of Medicine**, v. 59, n. 3, p. 424-426, 1975.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 2402, p. 1-12, 2002.

CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis. An annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, v. 6, n. 2-3, p. 105-116, 1976.

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 335-350.

CARMICHAEL, L. E. Brucelosis canina causada por *B. Canis*: enfermidade clínica; problemas en imunodiagnóstico. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 80, n. 2, p. 102-106, 1998.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 573-584.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 248-257.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **Cornell Veterinarian**, v. 78, n. 1, p. 63-73, 1988.

CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 152, n. 6, 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.; SHIN, S. J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 161-165, 1996.

CASANAS, M. C.; QUEIPO-OPORTUNO, M. I.; RODRIGUEZ-TORRES, A.; ORDUNA, A.; COMENERO, J. D.; MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 127-131, 2001.

CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.; BRUNO, L.; WALLACH, J. C.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucella*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 111-114, 2004.

CAVALCANTI, L. A.; DASSO, M. G.; OLIVEIRA, F. C. S.; VIEGAS, S. A. R. A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALCANTARA, A. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; OLIVEIRA, E. M. D. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n2, p. 176-180, 2006.

CICUTA, M. E.; MIRANDA, A. O. Primer aislamiento de *Brucella canis* em La ciudad de Corrientes, Argentina. **Veterinaria Argentina**, v. 7, n. 67, p. 463-465, 1990.

CLEGG, F. G.; RORRISON, J. M. *Brucella abortus* infection in the dog. A case of polyarthritis. **Research in Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 183-185, 1968.

COLMENERO, J. D.; QUEIPO-OPORTUNO, M. I.; MARIA REGUERA, J.; ANGEL SUAREZ-MUNOZ, M.; MARTIN-CARBALLINO, S.; MORATA, P. Chronic hepatosplenic abscesses in brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.42, p. 159-167, 2002.

CÔRTEZ, J. A.; OLIVEIRA, M. C. G.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo-Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

CURRIER, R. W.; RAITHEL, W. F.; MARTIN, R. J.; POTTER, M. E. Canine brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 132-133, 1982.

DAHOUK, S. A. L.; TOMASO, H; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis – A review of the Literature. **Clinical Laboratory**, v. 49, p. 487-505, 2003.

DAWKINS, B. G.; MACHOTKA, S. V.; SUCHMANN, D.; MCLAUGHLIN, R. M. Pyogranulomatous dermatitis associated with *Brucella canis* infection in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 11, p. 1432-1433, 1974.

DZIEZYC, J. Canine systemic bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1103-1117, 2000.

ELFAKI, M. G.; UZ-ZAMAN, T.; AL-HOKAIL, A. A.; NAKEEB, S. M. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polimerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p. 1-7, 2005b.

FERNANDES, J. C. T.; WALD, V. B.; JOBIM, G. B. Isolamento de *Brucella canis* do humor aquoso de um cão com lesões oculares. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 4, n. 5, p. 109-113, 1976/77.

FORBES, L. B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

FOSTER, G.; MAC MILLAN, A. P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H. M. M.; CLOECKAERT, A.; REID, R. J., BREW, S.; PATTERSON, I. A. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n 1-4, p. 563-580, 2002.

FLORES-CASTRO, R.; SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. **Cornell Veterinarian**, v. 66, n. 3, p. 347-352, 1976.

FLORES-CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ-PFEIFFER, C.; CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis: Bacteriological and Serological Investigation of Naturally Infected Dogs in Mexico City. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 591-597, 1977.

GALPHIN, S. P. A serological survey for *Brucella canis* in dogs on a military base. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 8, p. 728-729, 1977.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. Antisperm response in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 2, p. 274-281, 1984.

GEORGE, L. W.; DUNCAN, J. R.; CARMICHAEL, L. E. Semen examination in dogs with canine brucellosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 40, n. 11, p. 1589-1595, 1979.

GERMANO, P. M. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ISHIZUKA, M. M.; PASSOS, E. C.; ERBOLATO, E. B. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas-SP, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.24, n. 1, p. 27-34, 1987.

GODOY, A. M.; PERES, J. N.; BARG, L. 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.; DRIEMEIER, D.; SOARES, H. C.; BASTOS, C. D.; CANTO, S. P.; BRUM, M.; ROSSI, A. C.; CORBELLINI, L. G. *Brucella canis*: isolamento em um cão com epididimite e orquite – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 18, p. 17-20, 1999.

GONZÁLEZ, H. B.; RAMÍREZ, R. M. P.; CASTRO, R. F.; GÜEMES, F. S. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. **Veterinaria Mexico**, v. 35, n. 2, p. 121-128, 2004.

GORDON, J. C.; PUE, H. L.; RUTGERS, H. C. Canine brucellosis in a household. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 86, n. 7, p. 695-698, 1985.

GREENE, C. E.; GEORGE, L. W. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 646-662.

HENDERSON, R. A.; HOERLEIN, B. F.; KRAMER, T. T.; MEYER, M. E. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 5, p. 451-455, 1974.

HIPOLITO, O. M. G.; FREITAS e FIGUEIREDO, J. B. **Doenças infecto-contagiosas dos Animais Domésticos**. 4ª Edição, Edições Melhoramentos, São Paulo, 495 p., 1965.

HOFF, G. L.; SCHNEIDER, N. J. Serologic survey for agglutinins to *Brucella canis* in Florida residents. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 1, p. 157-159, 1975.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375 p.

HUBBERT, N. L.; BECH-NIELSEN, S.; BARTA, O. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 2, p. 168-171, 1980.

IRIBARREN, F.; BREGLIA, J.; CASTILLO, M.; ESCOBAR, V.; HOFFMAN, F. Comparación de las pruebas de inmunodifusión del gel de agar con antígeno de *Brucella ovis* y de aglutinación en placa con *Brucella canis* M(-) para el diagnóstico de la brucelosis canina. **Veterinaria Argentina**, v. 16, n. 152, p. 146-151, 1999.

JENNINGS, P. B.; CRUMRINE, M. H.; LEWIS, G. E.; FARISS, B. L. The effect of a two-stage antibiotic regimen on dogs infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 164, n. 5, p. 513-514, 1974.

JOHNSON, C. A.; BENNETT, M.; JENSEN, R. K.; SCHIRMER, R. Effect of combined antibiotic therapy on fertility in brood bitches infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 11, p. 1330-1333, 1982.

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.

JONES, R. L.; EMERSON, J. K. Canine brucellosis in a commercial breeding kennel. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 7, p. 834-835, 1984.

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 pela polimerase.** 2001. 96f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados.** 2006, 134f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; MORAIS, Z. M.; RICHTZENHAIN, L. J. VASCONCELLOS, S. A. *Brucella spp.* isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 161-166, 2004a.

KERWIN, S. C.; LEWIS, D. D.; HRIBERNIK, T. N.; PARTINGTON, B.; HOSGOOD, G.; EILTS, B. E. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 8, p. 1253-1257, 1992.

LARSSON, M. H. M. A. **Estudo epidemiológico da brucelose canina.** 1979. 50f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

LARSSON, M. H. M. A. Pesquisa de aglutininas anti-*Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 404-407, 1980.

LARSSON, M. H. M. A.; COSTA, E. O. Isolation of *Brucella canis*. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, n. 2, p. 125-130, 1980.

LARSSON, M. H. M. A.; LARSSON, C. E.; FERNANDES, W. R.; COSTA, E. O.; HAGIWARA, M. K. *Brucella canis*: inquéritos sorológico e bacteriológico em população felina. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 47-50, 1984a.

LARSSON, M. H. M. A.; COSTA, E. O.; LARSSON, C. E.; GUERRA, J. L.; HAGIWARA, M. K. Brucelose canina experimental: estudos bacteriológico, sorológico e anatomopatológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 141-156, 1984b.

LATORRE, M. R. D. O.; Medidas de risco e regressão logística. In: MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. **Métodos quantitativos em medicina**. Barueri: Manole, p. 337-350, 2004.

LEWIS, G. E.; ANDERSON, J. K. The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. **American Journal of Public Health**, v. 63, n. 3, p. 204-205, 1973.

LÓPEZ, G.; AYALA, S. M.; EFRON, A. M.; GÓMEZ, C. F.; LUCERO, N. E. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. **Revista Argentina e Microbiologia**, n. 41, p. 97-101, 2009.

LOVEJOY, G. S.; CARVER, H. D.; MOSELEY, I. K.; HICKS, M. Serosurvey of dogs for *Brucella canis* infection in Memphis, Tennessee. **American Journal of Public Health**, v. 66, n. 2, p. 175-176, 1976.

LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; JACOB, N. O. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*, **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 457-461, 2005a.

LUCERO, N. E.; JACOB, N. O.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; TUCCILLO, P. JACQUES, I. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*, **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 505-508, 2005b.

MAIA, G. R.; ROSSI, C. R. S.; ABBADIA, F.; VIEIRA, D. K.; MORAES, I. A. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói-RJ. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 425-427, 1999.

MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTÍN, M.; SOLER, M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 7, p. 1043-1046, 1993.

MELO, S. M. B.; AGUIAR, P. H. P.; NASCIMENTO, R. M.; FREIRE, S. M. Avaliação sorológica por imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo – Camaçari – Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 19, n. 1, p. 119-127, 1997/98.

MEGID, J.; BRITO, A. F.; MORAES, C. C. G.; FAVA, N.; AGOTTANI, J. Epidemiological assessment of canine brucellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 439-440, 1999.

MEGID, J.; MORAES, C. C. G.; MARCOS JR. G.; AGOTANNI, J. V. B. Perfil sorológico, isolamento bacteriano e valores hematológicos e urinários em cães naturalmente infectados com *Brucella canis*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 3, p. 405-409, 2000.

MINHARRO, S.; COTTORRELLLO, A. C. P.; MIRANDA, K. L.; STYNEN, A. P. R., ALVES, T. M., LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.167-173, 2005.

MIRANDA, A. O.; COLMAN, O. L. R.; MANCEBO, O. A.; MONZÓN, C. M. Detección serológica de anticuerpos anti *Brucella canis* en perros y humanos en el oeste de Formosa. **Veterinaria Argentina**, v. 3, n. 22, p. 158-161, 1986.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; CARVALHO, M. Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 121, p. 45-49, 2001.

MOORE, J. A. *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 12, p. 2034-2037, 1969.

MOORE, J. A.; BENNETT, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion. **Veterinary Record**, v. 80, n. 20, p. 604-605, 1967.

MOORE, J. A.; GUPTA, B. N.; CONNER, G. H. Eradication of *Brucella canis* infection from a dog colony. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.153, n.5, p. 523-527, 1968.

MOORE, J. A.; KAKUK, T. J. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 8, p. 1352-1358, 1969.

MOORE, J. A.; GUPTA, B. N. Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1737-1742, 1970.

MORAES, C. C. G.; MEGID, J.; SOUZA, L. C.; CROCCI, A. J. 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.

MYERS, D. M.; VARELA-DIAZ, V. M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. **Cornell Veterinarian**, v. 70, n. 3, p. 258-265, 1980.

MUNFORD, R. S.; WEAVER, R. E.; PATTON, C.; FREELEY, J. C.; FELDMAN, R. A. Human disease caused by *Brucella canis*. A Clinical and Epidemiologic Study of Two Cases. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 12, p. 1267-1269, 1975.

NÁREZ, G. M.; CORTÉS, E. M.; REYNOSO, B. A.; BASILIO, J. I. M.; APARICIO, E. D. Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de perros en la ciudad de Mexico. **Técnica Pecuaria en Mexico**, v. 37, n. 3, p. 43-50, 1999.

NICOLETTI, P.; CHASE, A. An evaluation Of Methods To Diagnose *Brucella canis* Infection in Dogs. **Compendium in Continuing Education for Small Animals**, v. 9, n. 11, 1987.

NISHIMURA, M.; NUKINA, M.; YUAN, J. M.; SHEN, B. Q.; M. A. J. J.; OHTA, M.; SAIDA, T.; UCHIYAMA, T. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. **Federation European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 142, p. 133-138, 1996.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOF, C. M.; GRAAT, E. A. M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen Press, 1997. 445 p.

ON, S.; HARRINGTON, C. S. Evaluation of numerical analysis of pfge-dna profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 285-293, 2001.

PICKERILL, P. A. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1741-1742, 1970.

PICKERILL, P. A.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 160, n. 12, p. 1607-1615, 1972.

POESTER, F. P., BONNETTI, M. V., CORREA, G. B. Brucelose canina no município de Uruguaiana, RS. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12, 1994, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do RS, Brasil, 1994, p. 167.

POLT, S. S.; DISMUKES, W. E.; FLINT, A.; SCHAEFFER, J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, n. 5, p. 717-719, 1982.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. Virginia: Wolfe, 1994. 648 p.

RANDHAWA, A. S.; DIETERICH, W. H.; HUNTER, C. C.; KELLY, V. P.; JOHNSON, T. C.; SVOBODA, B.; WILSON, D. F. Prevalence of seropositive reactions to *Brucella canis* in a limited survey of domestic cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 3, p. 267-268, 1977.

RIECKE, J. A.; RHOADES, H. E. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 6, p. 583-584, 1975.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

ROBERTSON, M. G. *Brucella* infection transmitted by dog bite. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 7, p. 750-751, 1973.

ROXO, E.; PINHEIRO, S. R.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, J. A. C.; GOUVÊA, G.; PIORUM, M. L.; LIMA, M. A. B. Brucelose canina: relato de uma possível transmissão de *Brucella canis* ao homem a partir de uma cadela da raça Doberman. **Boletim Informativo Controle de Zoonoses Urbanas**, v. 13, n. 1, p. 47-49, 1990.

SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 39, n. 2, p. 181-185, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular cloning. **A laboratory Manual**, 2nd. ed., vols. I, II, III. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York, 1989.

SANDOVAL, L. A.; RIBEIRO, L. O. C.; AMARAL, L. B. S.; FEITOSA, M. H.; BAZAN, J. M. Incidência da brucelose canina na cidade de São Paulo. **Biológico**, v. 42, n. 5-6, p. 128-132, 1976.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N. A survey of dogs from Gifu and Shiga area for *Brucella canis*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 39, n. 6, p. 635-642, 1977.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N. Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, n. 3, p. 353-355, 1978.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 41, n. 6, p. 607-616, 1979.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; YAMADA, J.; TAKADA, H.; Spermagglutination and spermagglutinating activity of serum and tissue extracts from reproductive organs in male dogs experimentally infected with *Brucella canis*, **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 43, n. 4, p. 469-490, 1981b.

SERIKAWA, T.; KONDO, Y.; TAKADA, H.; YAMADA, J. Head-to-head type auto-sperm agglutination with IgA antibody to acrossome induced by *Brucella canis* infection, **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, n. 1, p. 41-48, 1984.

SCHOEB, T. R.; MORTON, R. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 5, p. 598-600, 1978.

SMEAK, D. D.; OLMSTEAD, M. L.; HOHN, R. B. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 8, p. 986-990, 1987.

SOUZA, L. A.; VIANA, R. C. A.; MICHALICK, M. S. M.; REIS, J. K. P.; LAGE, A. P. Prevalência da infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte – MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 127-131, 2002.

SPINK, W. W. Comments on canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1734 – 1736, 1970.

SWENSON, R. M.; CARMICHAEL, L. E.; CUNDY, K. R. Human infection with *Brucella canis*. **Annals of Internal Medicine**, v. 76, n. 3, p. 435-438, 1972.

SUZUKI, E. Y.; PENHA, G. A.; UEDA, F. S.; SALVARANI, R. S.; ALVES, M. L.; ZAPPA, V. **Brucelose canina: Revisão de Literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n. 10, janeiro de 2008. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisão/edic-vi-n10-RL11.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2008.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995. 479 p.

UEDA, K.; MAGARIBUCHI, T.; SAEGUSA, J.; URANO, T.; ITOH, K.; KIUCHI, Y.; FUJIWARA, K. Spontaneous *Brucella canis* infection in beagles: bacteriological and serological studies. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 5, p. 381-389, 1974a.

UEDA, K.; SAEGUSA, J.; FUJIWARA, K.; MUTO, S.; OKADA, K. Detection of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 6, p. 539-542, 1974b.

VARGAS, A. C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; POESTER, F. Brucelose canina: relato de caso. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.

VASCONCELOS, R. T. J.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, F. A. L.; BATISTA, C. S. A.; BERNARDI, F.; SOTO, F. R. M.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 436-442, 2008.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I.; LEIVA, J.; DIAZ, R.; MORYION, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 759-768, 1998.

VIEIRA, D. K.; MORAES, I. A.; ROSSI, C. R. S.; RAMOS, M. L. M.; BARRETO, L. S.; Identificação de cães reagentes à *Brucella canis* nos ambientes rural e urbano no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 123, 2000. Suplemento.

VIERA, N. R. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados.** 2004. 92f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às

Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

WALLACH, J. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; BALDI, P. C.; FOSSATI, C. A. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 146-148, 2004.

WALD, V. B.; FERNANDES, J. C. T. Sorologia da brucelose canina no município de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 4, n. 5, p. 92-95, 1976/77.

WALKER, R. L. Brucella. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. p. 1851-191.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 367-375, 2002.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**, v. 66, p. 1573 -1578, 2006.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3741-3751, 1997.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

ZOHA, S. T.; CARMICHAEL, L. E. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35-50, 1982.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS**

**Levantamento epidemiológico da Brucelose Canina no município de Patos,
Paraíba**

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. DADOS DO PROPRIETÁRIO	
Nome:	
Endereço:	
N°:	
	Bairro:
	CEP:
	Telefone:
Grau de escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1° Grau incompleto <input type="checkbox"/> 1° grau completo <input type="checkbox"/> 2° grau incompleto <input type="checkbox"/> 2° grau completo <input type="checkbox"/> 3° Grau incompleto <input type="checkbox"/> 3° Grau completo
Já ouviu falar ou sabe o que é Brucelose Canina? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Porque motivo trouxe o animal?	
2. DADOS DO ANIMAL	
Nome:	
Sexo:	<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea
Idade :	<input type="checkbox"/> 6 – 12 meses <input type="checkbox"/> 12 – 24 meses <input type="checkbox"/> 24 – 48 meses <input type="checkbox"/> 4 – 6 anos <input type="checkbox"/> acima de 6 anos
Raça:	<input type="checkbox"/> Sem raça definida <input type="checkbox"/> Com raça definida Qual?
O animal apresentou alguma vez orquite (MACHOS)? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Já sofreu casos de abortamento? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Nos partos aconteceram casos de natimortos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
3. MANEJO	
Tipo de criação:	<input type="checkbox"/> Domiciliar <input type="checkbox"/> Semi-domiciliar <input type="checkbox"/> Solto
Alimentação :	<input type="checkbox"/> Ração comercial <input type="checkbox"/> Alimento preparado em casa <input type="checkbox"/> Restos de comida

Tem contato com outros animais? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Se tem, quais são? <input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Equídeos <input type="checkbox"/> Silvestres <input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Caprinos/ovinos <input type="checkbox"/> Suínos	
Qual o ambiente onde o animal é criado?	<input type="checkbox"/> terra <input type="checkbox"/> cimento <input type="checkbox"/> terra/cimento
É realizada limpeza ou desinfecção do local? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Com que frequência?	<input type="checkbox"/> Diária <input type="checkbox"/> Semanal <input type="checkbox"/> Quinzenal <input type="checkbox"/> Mensal
Qual o destino dos materiais de abortamento?	<input type="checkbox"/> Não faz nada <input type="checkbox"/> Enterra/Queima <input type="checkbox"/> Joga no lixo <input type="checkbox"/> Alimenta outros animais
O animal tomou alguma vacina? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Se sim, quais?	
Costuma passear com o animal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Quando viaja, leva-o junto? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Há quanto tempo viajou? Local:	
OBRIGADA PELA COLABORAÇÃO!	