



PIBIC/CNPq/UFPG-2009

BRUCELOSE POR *Brucella canis* EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DO CSTR/UFPG: INQUÉRITO SOROLÓGICO, FATORES DE RISCO E CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO POR PCR

Annielle Regina F. Fernandes¹, Sérgio Santos de Azevedo^{2*}, Carla Lauise R. M. Pimenta³, Iana Carolina Pordeus Uchôa³, Arthur Willian L. Brasil³, Nayara da Silva Medeiros³, Márcia Almeida de Melo², Clebert José Alves², Rosa M. Piatti⁴, Eliana S. Pinheiro⁴, Carolina de Sousa A. Batista⁵, Adílio S. Azevedo⁶, Margareth E. Genovez⁴, Leonardo Mendes Torres⁷

RESUMO

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

BRUCELLOSIS DUE TO *Brucella canis* IN DOGS ATTENDED ON VETERINARY HOSPITAL OF THE CSTR/UFPG: SEROLOGICAL SURVEY, RISK FACTORS AND CONFIRMATION OF THE INFECTION BY PCR

ABSTRACT

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 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

¹ Aluna bolsista do CNPq do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: anni.regina@gmail.com.

² Médico Veterinário, Prof. Doutor, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br, * Orientador

³ Alunos do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB

⁴ Pesquisador Científico, Instituto Biológico de São Paulo, SP.

⁵ Doutoranda, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP.

⁶ Mestrando, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.

⁷ Médico Veterinário autônomo, Centro Médico Veterinário Dr. Leonardo Mendes Torres

INTRODUÇÃO

Os cães de companhia apresentam hoje uma inserção muito grande na sociedade, o que gera preocupação em relação à sanidade desses animais. Nesse contexto, atenção deve ser dada à brucelose canina, que acarreta problemas reprodutivos em machos e fêmeas, prejuízos ao criador de cães e ainda causa importante zoonose (MINHARRO et al., 2005)

No 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). Os registros de cães e gatos infectados por brucelas lisas referiram bacteremia transitória associada à orquite, epididimite, linfadenopatia e abortamento (KARLSON e CLAUSEN, 1940; NOLAN, 1940; BARR et al., 1986; FORBES, 1990), no entanto, também foram observadas infecções sub-clínicas e auto-limitantes (HALL, 1971; RANDHAWA et al., 1977).

O agente da brucelose canina foi isolado pela primeira vez em 1966, durante episódios de abortamentos em canis de Nova Jersey, Estados Unidos da América (CARMICHAEL, 1966), da placenta e tecidos fetais de cadelas que abortaram, 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).

A *Brucella canis* é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, aeróbica, sem cápsula e não formadora de esporos (CARMICHAEL e GREENE, 1998). Cresce bem em meios enriquecidos como ágar-*Brucella* enriquecido com 5% de sangue ovino (QUINN et al., 1994). O crescimento ocorre em dois ou três dias onde se visualiza colônias pequenas (1,0-1,5 mm de diâmetro), não causam hemólise, são translúcidas, brilhantes, convexas de bordos arredondados e bem definidos. Como características bioquímicas é oxidase positiva, catalase positiva, citrato negativa, Mac Conkey negativa, motilidade negativa, não produz H₂S, reduz o nitrato e é produtora de urease. Esse agente causa uma bacteremia intermitente e de extensa duração, desenvolvendo algumas alterações reprodutivas (MOORE et al. 1967). Ao contrário de outras infecções sistêmicas, os animais estão aparentemente sadios (CARMICHAEL, 1998; DZIEZYC, 2000).

Nas fêmeas, o principal sinal clínico é o abortamento 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 (JOHNSON e WALKER, 1992; DZIEZYC, 2000). No macho, está associada à epididimite, dermatite do escroto, atrofia testicular e infertilidade. Além dos transtornos reprodutivos, podem ocorrer discospondilite, osteomielite, meningite, uveíte, glomerulonefrite e dermatite piogranulomatosa (DZIEZYC, 2000).

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

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).

Dessa forma, o diagnóstico da doença baseia-se no isolamento do agente através de hemocultura e cultivo de material abortado, secreções vaginais e uterinas, urina, sêmen e líquido prostático. Também pode ser realizado através da sorologia dos animais, sendo esse método o mais utilizado em função da praticidade e da dificuldade de realização do isolamento bacteriano (JOHNSON & WALKER, 1992).

Testes sorológicos como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) são comumente utilizados e empregam antígenos de superfície. 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 *Brucella ovis*, amostra Reo 198, padronizado por comparação com o antígeno de referência. É empregado na forma liofilizada para a detecção de anticorpos contra *Brucella ovis* e *Brucella canis*. 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. O resultado final é relatado após a leitura de 72 horas.

Vários inquéritos soroepidemiológicos utilizando a prova de IDGA foram conduzidos no Brasil com o objetivo de determinar a soropositividade para a *Brucella canis*.

Côrtes et al. (1988), em São Paulo, utilizaram a técnica de IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *Brucella canis*, e encontraram 254 (7,5%) positivos em 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, em 14 localidades distribuídas pelas quatro divisões regionais da cidade (Norte, Sul, Leste e Oeste).

Na cidade de Patos, Paraíba, Alves et al. (1999), utilizaram a técnica de IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *Brucella canis*, e constataram 3,6% (8/221) de positividade em cães submetidos à campanha anual de vacinação anti-rábica.

Na cidade de Alfenas, Minas Gerais, Almeida et al. (2001) utilizaram a IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *Brucella canis*. De um total de 102 cães atendidos no Hospital Veterinário da Unifenas, no período de fevereiro a junho de 2000, cinco (4,9%) foram positivos.

Moraes et al. (2001) empregaram a IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *Brucella canis*, e encontraram 11 (9,2%) animais positivos em 119 cães originários dos bairros que compõem a Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro.

Melo et al. (1997/98), pela técnica de IDGA aplicada ao diagnóstico da brucelose por *Brucella canis*, obtiveram 40 (37%) animais positivos em 108 cães provenientes do distrito de Monte Gordo, Camaçari, Estado da Bahia.

Azevedo et al. (2003) examinaram 410 cães durante a campanha de vacinação anti-rábica de 1999 em Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo, utilizando a IDGA em soros normais, IDGA em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol e reação de fixação de complemento (RFC), aplicados em série, e encontraram uma soroprevalência de 2,2% (IC 95% = 1,01% - 4,13%), bem como verificaram que cães submetidos a um manejo do tipo solto apresentaram maior risco de serem soropositivos.

Carmichael (1990) refere que resultados falso-positivos são comuns pela reação cruzada com antígenos de várias bactérias como *Pseudomonas*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Além disso, testes sorológicos resultam negativos durante as primeiras quatro semanas pós-infecção devido à uma queda na bacteremia, e aqueles positivos podem sempre ser confirmados por métodos diagnósticos mais específicos.

Segundo Keid et al. (2007), a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando amostras de sêmen e swab vaginal, é um bom candidato como teste confirmatório para o diagnóstico da brucelose em cães. O PCR de sêmen é um teste mais sensível mesmo naqueles animais em que os exames sorológicos e microbiológicos fornecem resultados negativos, e seu desempenho é similar à cultura e PCR de sangue. Já o PCR de swab vaginal também é satisfatório em animais suspeitos de estarem infectados, especialmente aqueles que resultaram negativos na cultura e PCR de sangue.

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 em nível de 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-*B. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos, identificar os fatores de risco associados à soropositividade nesses animais e confirmar a infecção por cultivo microbiológico e técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados cães que passaram pelo atendimento da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, do Centro Médico Veterinário Dr. Leonardo Torres, bem como através de visitas aos bairros da cidade de Patos 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.

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 → $P = 50\%$ (para maximizar a amostra)

d = erro absoluto → $d = 10\%$

Com base nesses parâmetros, o número de animais a serem amostrados foi de 96, no entanto, por motivos de segurança, foram utilizados 193 cães.

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 do CSTR, aonde foram centrifugadas para a obtenção do soro e estocadas a -20°C para posterior realização do diagnóstico sorológico da infecção.

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.

Diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella canis*

Foram utilizados “kits” produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) (Figura 1). 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, 100mL 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 2), sendo um orifício central e seis dispostos ao redor deste, cada orifício com capacidade de 50 μ L. Após a retirada do ágar, os poços foram preenchidos com soros controles positivos, soros testes e antígeno (Figura 3). 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 1: Kit para realização de IDGA.



Figura 2: Perfuração do gel de agar.

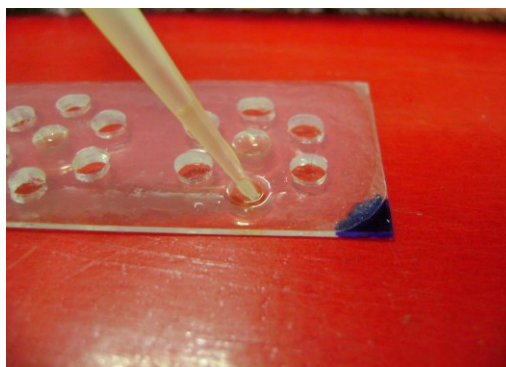


Figura 3: Distribuição dos soros no gel de agar.

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* (Difco) enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado, após manutenção por três dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e Tioglicolato de sódio (Figura 4).

Provas bioquímicas como catalase, motilidade, 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.

Reação em Cadeia pela Polimerase

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). Suspensão composta por 1000 µL de água ultrapura (Milli-Q®), correspondente à escala 8 de MacFarland (2,3 x 10⁹ bact/mL), 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. A seqüência dos *primers* para *Brucella* spp. foram as seguintes :

Primer forward B4 - 5' TGGCTCGGTTGCCAATATCAA 3'

Primer reverse B5 - 3' CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG 5'

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500 µl com volume final de 50 µl, segundo Sambrook et al. (1989) e Baily et al.(1992). Foram adicionados 15 µl de água, 5 µl de tampão 10 X (500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 8 µl da mistura de dNTPs (200 µ M de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 5 µl dos primers (B4 e B5 – 10 pmol/ml de cada), 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por µl) e 10 µl da amostra de DNA extraído.

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
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 µg/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).

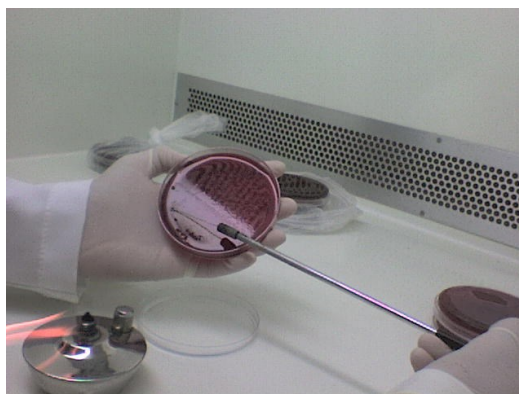


Figura 4: Cultivo das amostras em ágar-*Brucella* com 5% de sangue ovino.

Posteriormente foi realizado um teste de gradiente de anelamento para avaliar qual a melhor temperatura na utilização da bactéria isolada para outros testes de PCR empregando-a como controle positivo. Neste teste, utilizou-se *primers* espécie-específicos para *Brucella canis*. Caso ocorresse amplificação em determinada temperatura, pode-se concluir que realmente trata-se de *Brucella canis*. Os *primers* foram os seguintes:

Primer forward Bc-01 5' GTGAAACTGCGAATGGCTCA 3'

Primer reverse Bc-02 5' TAGGGGATCGAAGACGATCA 3'

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, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente (condição do animal – soropositivo ou soronegativo), de modo que aquelas que apresentaram um valor de $p \leq 0,2$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999) foram selecionadas e oferecidas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER; LEMESHOW, 2000), para a definição de um modelo que melhor identificasse os fatores de risco. O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 for Windows.

Confecção 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 193 soros analisados pela prova da imunodifusão em gel de ágar (IDGA), seis amostras apresentaram reação positiva, cuja linha de precipitação apresentou identidade com a linha formada pelo soro padrão (Figura 5), correspondendo a uma prevalência de 3,11% (IC 95% = 1,15% – 6,64%). A distribuição geográfica das residências dos animais é apresentada na Figura 6, onde se observa uma maior concentração de cães da zona urbana.

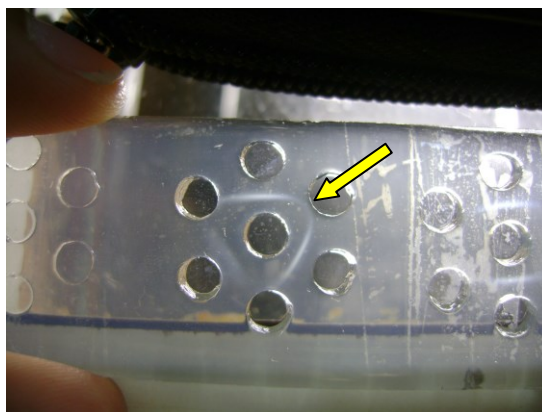


Figura 5: Reação positiva na IDGA para brucelose.

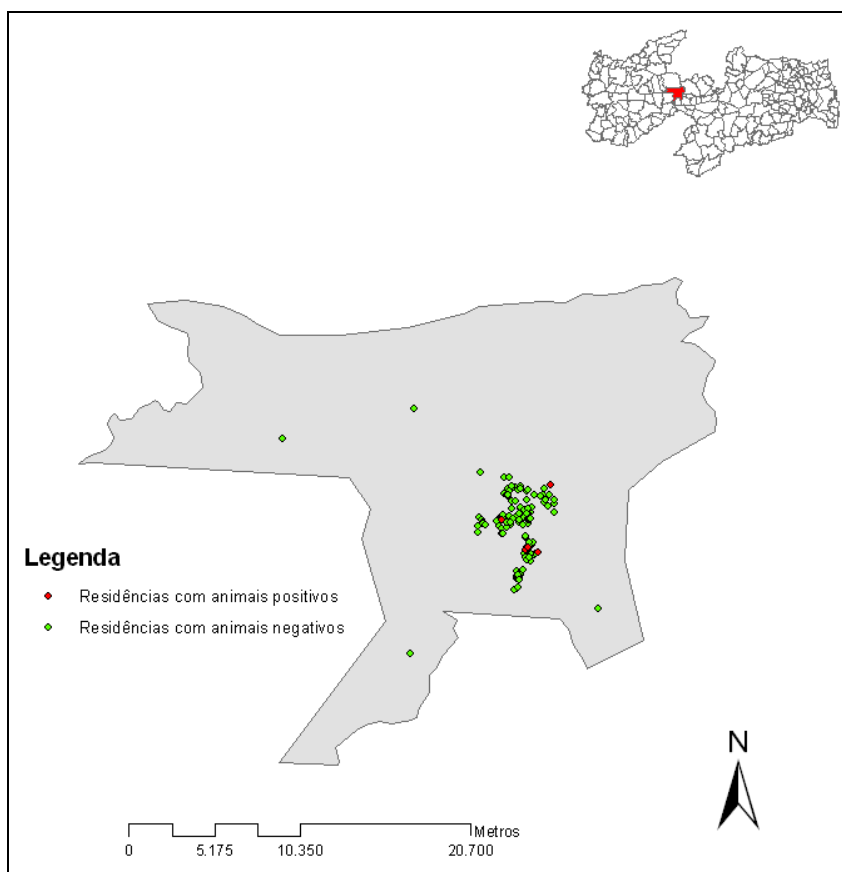


Figura 6: Mapa do município de Patos demonstrando a localização geográfica das residências dos cães soropositivos e soronegativos. Detalhe ilustrando a localização do município de Patos no Estado da Paraíba.

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 cães 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. No presente trabalho, foi examinada uma

amostra de animais que não apresentava histórico de problemas reprodutivos que poderiam ser sugestivos de brucelose canina.

Resultados superiores 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. Naquele estudo, foi empregado como teste diagnóstico a imunodifusão em gel de ágar com antígeno produzido pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CPZ), a população canina estudada era constituída apenas de cães errantes e não foram estabelecidos critérios quanto ao tamanho amostral, de modo que os animais examinados não estavam distribuídos por toda a extensão geográfica do município, o que poderia justificar as diferenças observadas em relação aos resultados do presente estudo.

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 raça, limpeza do ambiente dos cães e passear com os cães (Tabela 1). 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 2). 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.

Neste estudo, outros fatores embora não identificados como de risco para a infecção por *Brucella canis* merecem ser destacados. Analisando-se o sexo como um possível fator de risco associado à soropositividade para *Brucella 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) e Moraes et al. (2002).

Já no que concerne à idade, foi observado que 68,9 % dos animais positivos tinham mais de um ano de idade. Resultados similares 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 *Brucella canis*, não foi observada significância estatística, ou seja, animais impúberes e sexualmente maduros estão igualmente expostos ao risco da infecção.

Com relação à análise de viagem como possível fator de risco associado à soropositividade para *Brucella canis*, embora os animais que acompanham seus proprietários durante viagens possam entrar em contato com outros cães, esse fato não foi apontado como fator de risco para a doença.

Tabela 1 – 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
	1° Grau incompleto	64	4 (6,3%)	
	1° Grau completo	18	0 (0,0%)	
	2° Grau incompleto	24	0 (0,0%)	
	2° Grau completo	43	1 (2,3%)	
	3° Grau incompleto	19	0 (0,0%)	
	3° 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%)	
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%)	

	Sim	121	2 (1,7%)	0,198*
Leva os animais quando viaja	Não	166	6 (3,6%)	
	Sim	27	0 (0,0%)	0,598
Contato com açudes	Não	164	6 (3,7%)	
	Sim	29	0 (0,0%)	0,594

* Variáveis selecionadas para a análise multivariada

Tabela 2 - 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

Quanto ao cultivo e isolamento de *Brucella canis*, foi possível localizar três dos seis animais soropositivos, dos quais foi colhido sangue com anticoagulante e medula óssea. Foi isolada uma bactéria com características morfotintoriais semelhantes à *Brucella canis* da medula óssea de um animal. A bactéria cresceu bem em meio enriquecido ágar-*Brucella*, no qual foram observadas colônias pequenas, não hemolíticas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos (Figura 7). A coloração de Gram revelou cocobacilos Gram-negativos. Os resultados dos testes bioquímicos estão apresentados na Tabela 3.

A partir da amostra isolada foi extraído DNA utilizando *primers* gênero-específicos para *Brucella* spp. (Figura 8). No teste de gradiente de anelamento a melhor temperatura averiguada foi de 54,3°C, e com isso a estirpe isolada realmente tratava-se de *Brucella canis*, uma vez que foram empregados os *primers* espécie-específicos.

Tabela 3 – Provas bioquímicas utilizadas para identificação de *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 urease	-

O presente trabalho é o primeiro a relatar o isolamento de *Brucella canis* de cães em nível de Nordeste brasileiro, o que foi confirmado pela PCR. Esse fato apresenta grande relevância para a epidemiologia da doença, uma vez que se trata de uma importante zoonose.

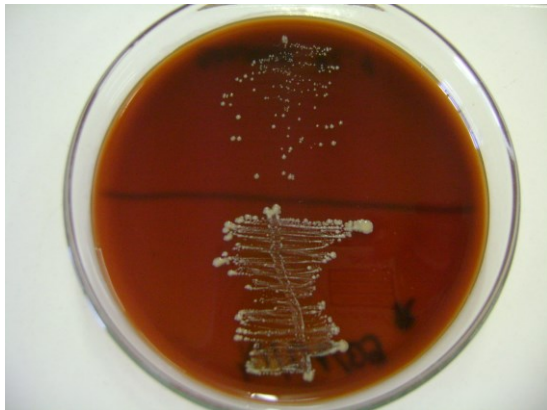


Figura 7 - Colônias bacterianas cultivadas em ágar-*Brucella*, isoladas de medula óssea de cão.

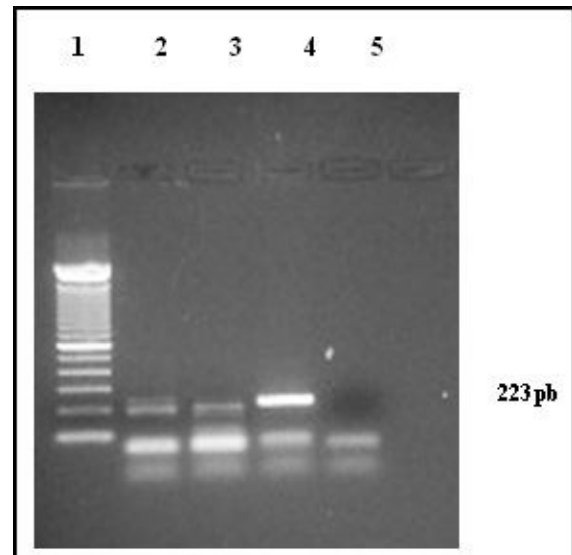


Figura 8 - Resultados da amplificação por PCR para detecção de *Brucella* spp.: 1- Marcador de peso molecular (DNA 100 pb Ladder - Invitrogen), 2 e 3- Amostra isolada, 4- Controle positivo (*Brucella abortus* - ATCC 544), 5- Controle negativo (água).

CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos com esse estudo, é possível concluir que:

- A prevalência de cães soropositivos para *Brucella canis* foi de 3,11% (IC 95% = 1,15% – 6,64%).
- Com base na análise de fatores de risco, 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.
- O presente trabalho é o primeiro a relatar o isolamento de *Brucella canis* de cães em nível de Nordeste brasileiro, o que foi confirmado pela PCR.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Ao Centro Médico Veterinário Dr. Leonardo Torres por ajudar na obtenção das amostras.

À professora Márcia Almeida Melo pela colaboração e realização do gradiente de anelamento.

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

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

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.

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.

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.

BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S. SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification J. Trop. Med. Hig., v. 95, p. 271-75, 1992.

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.

CARMICHAEL, L. E. Abortions in 200 Beagles. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 8, p. 1126, 1966.

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

CARMICHAEL, L. E. Brucelose canina causada por *B. canis*: enfermidade clínica; problemas em imunodiagnóstico. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 80, n. 2, p. 102-106, 1998.

CARMICHAEL, L. E.; BRUNER, D. W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **Cornell Veterinarian**, v. 58, n. 4, p. 579-592, 1968.

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.

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.

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

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

FREDRICKSON, L. E.; BARTON, C. E. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 11, p. 987-989, 1974.

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.

HALL, W. H. Epidemic brucellosis in beagles. **Journal of Infectious Diseases**, v. 124, n. 6, p. 615-617, 1971.

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.

KARLSON, A. G.; CLAUSEN, L. B. Brucellosis in a dog. **Cornell Veterinarian**, v. 30, n. 4, p. 546-547, 1940.

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- MINHARRO, S.; COTTARELLO, 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 serologica 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.
- MORAES, I. A.; LARANJA, H. F.; VIEIRA, D. K.; LOPES, S.; FREAZA, A.; MELO, G.; PENCHEL, V. Identificação de cães potenciais transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade de Medicina Veterinária da Bahia, 2001. p. 163.
- 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.
- MOORE, J. A.; BENNETT, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion. **Veterinary Record**, v. 80, n. 20, p. 604-605, 1967.
- 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. **Tecnica Pecuaria en Mexico**, v. 37, n. 3, p. 43-50, 1999.
- 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. **FEMS Microbiol Lett**, v. 142, p. 133-138, 1996.
- NOLAN, A. F. A sporadic case of brucellosis in the dog. **Cornell Veterinarian**, v. 30, n. 4, p. 542-545, 1940.
- 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. **J Appl Microbiol**, 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.

POESTER, F. P., BONNETTI, M. V., CORREA, G. B. Brucelose canina no municipio 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.

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.

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.

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

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

WANKE, M. M.; Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 195-207, 2004.