

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Curso de Medicina Veterinária

Catherine Biondo Feitosa

**FREQUÊNCIA DA BRUCELOSE CANINA EM CÃES
ATENDIDOS EM CAMPANHAS DE CONTROLE POPULACIONAL
ANIMAL NA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**

São Paulo
2018

Catherine Biondo Feitosa

**FREQUÊNCIA DA BRUCELOSE CANINA EM CÃES
ATENDIDOS EM CAMPANHAS DE CONTROLE POPULACIONAL
ANIMAL NA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.
Orientadora: Prof^a. Dra. Amane Paldês Gonçalves

São Paulo

2018

**FREQUÊNCIA DA BRUCELOSE CANINA EM CÃES
ATENDIDOS EM CAMPANHAS DE CONTROLE POPULACIONAL
ANIMAL NA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dra. Amane Paldês Gonçalves

São Paulo, de Dezembro de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr.....

Prof. Dr.....

Prof. Dr.....

Conceito Final: _____

Agradeço a Deus por Seu amor ao me ouvir, abençoar guardar, prover tudo que precisei nesses longos anos, me sustentando até aqui, por provar que os Teus planos para nossas vidas sempre são maiores que os nossos sonhos!

Gratidão ao meu pai, Roberto Luiz Feitosa, e a minha mãe, Ilka Santos Biondo Feitosa, pelo amor, compreensão e principalmente por terem se privado de muitos prazeres da vida para me proporcionar uma das maiores heranças que se pode deixar a um filho: educação e ensino, além do incentivo para ser uma pessoa melhor neste mundo! Sou eternamente grata, e... Amo vocês!

Ao Meu irmão, Christian Biondo Feitosa, por seu companheirismo.

Ao meu amigo, companheiro, amor da minha vida, José Paulo, por sempre estar torcendo ao meu lado, pela paciência e apoio, me conheceu em uma fase que tive que abrir mão de muitas coisas, inclusive do nosso relacionamento para que eu pudesse estudar, e ainda assim, esteve do meu lado, dizendo: Vai dar tudo certo! Obrigada amor, por existir em minha vida! Te amo!

A minha avó materna, Laura Santos Biondo (in memoriam), me acompanhou até o terceiro ano de faculdade, sempre me incentivou que embora aparecessem obstáculos difíceis em meu caminho, é preciso sempre seguir em frente! E depositar meus sonhos nas mãos do Senhor!

Ao meu avô materno, Augusto Biondo (in memoriam), me acompanhou até o ensino médio, mas faz parte de tudo isso, pois sempre cuidou de mim, era meu companheiro todos os dias quando saía da escola, "lá estava ele, me acompanhando até em casa..."

A minha avó paterna, Maria Lucia Oliveira, por sempre me acompanhar, estar presente em todos os momentos de nossas vidas, ajudar e apoiar sempre quando precisamos!

Ao meu avô paterno, Rufino Alves Feitosa, o "culpado" por me ensinar desde criança a amar os animais!

Aos demais familiares e meus verdadeiros amigos que sempre estiveram ao meu lado, torcendo e vibrando por mim em cada etapa, amo e guardo vocês em meu coração!

*Ao longo das nossas vidas, Deus coloca pessoas em formas de bênçãos em nossos caminhos, uma delas é a minha orientadora **Amane Paldês Gonçalves**, mais que uma professora, uma mulher de exemplo e valor, um profissionalismo do qual passei a admirar. Presente decisivamente, desde o início, em todas as etapas da minha Iniciação Científica, sendo a “primeira a sentar” nas cadeiras para assistir e comemorar após as apresentações (isso me marcou muito), me deu assistência até o término de todas as fases. Obrigada!*

*Aos meus professores, colegas de graduação, funcionários da UNISA, aprimorandos e médicos veterinários que cruzaram meus caminhos, tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, aprender lições que levarei para a vida. Em especial, as professoras **Adriana Cortez**, pelos conselhos e apoio sempre quando precisei, e a professora **Cidéli Coelho** por ter me dado à oportunidade de conhecer o mundo da homeopatia durante a graduação. Levo todos em meu coração!*

A UNISA e seus docentes, pela oportunidade de me ensinar a amar o ensino e a pesquisa.

Agradeço também aquelas pessoas de que alguma forma “jogaram pedras” em meu caminho, para me fazerem tropeçar, mas... Com elas pude construir castelos!

Enfim...

Hoje não quero pedir meu Deus, apenas AGRADECER por todas as bênçãos e pedir uma bênção especial na vida de cada um!

“Nada temos a temer quanto ao futuro, a menos que nos esqueçamos como Deus nos guiou no passado...”

Ellen G. White

RESUMO

A domesticação de cães tornou a convivência do homem cada vez mais próxima e afetuosa com estes animais. Nos últimos anos, a forte interação da sociedade com os animais de companhia, faz com que a atenção á sanidade dos mesmos seja despercebida. Dentre as inúmeras doenças que acometem os cães, destaca-se, a brucelose canina como uma doença infectocontagiosa e de caráter zoonótico. A espécie de *Brucella* que acomete os cães é a *Brucella canis*, que ocasiona desordens reprodutivas em machos e fêmeas, prejuízos aos criadores de canis comerciais, além de apresentar riscos aos manipuladores e tutores dos cães por ser considerada uma importante zoonose que pode acometer o homem, através contato com animais infectados ou materiais contaminados por *B. canis*, de modo que, coloque em risco a saúde humana. O objetivo desde trabalho foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*B. canis* e anti-*B. abortus* em cães provenientes da Ilha do Bororé localizada no extremo sul do município de São Paulo. Foram examinadas 50 amostras de soro de cães de idade e raças variadas e de ambos os sexos, colhidas durante campanhas de esterilização cirúrgica realizadas. Para a pesquisa de anticorpos anti-*B. canis*, as amostras foram testadas por meio do teste de imunoensaio cromatográfico. Quanto à pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus*, as amostras foram submetidas à prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), preconizada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Diante disso, de acordo com os resultados apresentados, conclui-se que, no local não foram encontrados resultados sorológicos positivos através do uso de provas sorológicas sensíveis e específicas para a detecção de *B. canis* e *B. abortus*.

Palavras-chave: *Brucella canis*, zoonose, imunoensaio cromatográfico

ABSTRACT

The domestication of dogs made the coexistence of the man increasingly closer and affectionate with these animals. In the latest years, the strong interaction of the society with the company animals made that the attention with their sanity became unnoticed. Among the innumerable diseases that rush dogs, stands out the canine brucellosis as an infectious-contagious disease and zoonotic character. The species *Brucella* that rushes the dogs is the *Brucella canis*, which causes reproductive disorders in males and females, damages to commercial kennels creators, besides presents risks to the manipulators and tutors of dogs by being considerate an important zoonosis which can rush the man, by the contact to infected animals or contaminated materials with *B. canis*, in a way that, put in risk the human healthy. The objective of this assignment was to evaluate the occurrence of antibodies anti-*B. canis* and anti-*B. abortus* in dogs from the Bororé Island located at the south end of the municipality of São Paulo. It were examined 50 samples of serum of dogs of different ages and breeds, collected during sterilization campaigns carried out. For the research of antibodies anti-*B. canis*, the samples were tested by means of chromatographic immunoassay. About the research of antibodies anti-*B. abortus*, the samples were submitted to Tamponade Acidified test (AAT), recommended by the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). On this, according the present results, it is concluded that in the local wasn't found positive serological results by the use of sensitive and specific serological tests to the detection of *B. canis* and *B. abortus*.

Keywords: *Brucella canis*, zoonosis, immunochromatographic

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resistência de *Brucella* spp. em determinadas condições ambientais.....

Quadro 2 – Patogenia da brucelose canina através das vias de transmissão da doença.....

Quadro 3 - Ocorrência da Brucelose canina na cidade de São Paulo com o emprego de métodos sorológicos e microbiológicos.....

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Razão de habitantes para cada cão ou gato, segundo CRS. MSP, 2015

Gráfico 2 – Forma de aquisição dos cães e gatos no município de São Paulo, segundo CRS. MSP, 2015.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Divisão do bairro Grajaú com a Ilha do Bororé.....
- Figura 2** – Delimitação urbana com preservação de Mata Atlântica na Ilha do Bororé.....
- Figura 3** – Sequência do procedimento utilizado no *kit* diagnóstico *Alere Brucelose Canina Ac Teste kit®*.....
- Figura 4** – Componentes do kit imunocromatográfico: cassete-teste, tubo de amostra contendo tampão diluente, tubos capilares de 10 µL.....
- Figura 5** – Resultados do teste de imunocromatografia. A presença de um cassete-teste apenas com linha-controle formada, identifica que o teste é não reagente, ou seja, a amostra é negativa (a). Cassete-teste com linha-controle formada e linha-teste formada, confirmando resultado reagente para *B. canis* (b).....
- Figura 6** – Placa de vidro utilizada para a mistura de soroantígeno, após o período de quatro minutos é colocada na caixa de leitura com luz indireta.....
- Figura 7** – Interpretação da prova de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), a presença dos grumos de aglutinação indica que o resultado é positivo (Amostra A). A ausência dos grumos de aglutinação apresenta resultado como negativo (Amostra B).....
- Figura 8** – Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), conhecido também como Rosa de Bengala destinado a triagem sorológica para diagnóstico da *B. abortus*.....
- Figura 9** – Caixa de leitura com luz indireta utilizada para proceder à leitura das reações de soro antígeno realizadas nas delimitações da placa de vidro, identificando se há formação de grumos nas amostras testadas indicando resultado reagente para *B. abortus*.....
- Figura 10** – Interpretação dos resultados do teste de imunocromatografia para *B. canis*, observa-se a formação de somente uma linha na janela de controle (letra C), indicativo de resultado não reagente.....
- Figura 11** – Na caixa de leitura não foi observado à formação de aglutinação nas amostras da placa de vidro, sendo indicativo de resultado não reagente para *Brucella abortus*.....

LISTA DE ABREVIATURAS

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)
IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)
AAT (Antígeno Acidificado Tamponado)
LPS (Lipopolissacarídeo)
PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal)
TAL (Anel em Leite)
FC (Fixação de Complemento)
EUA (Estados Unidos da América)
SAR (Soroaglutinação rápida)
SAL (Soroaglutinação lenta)
SAR-2ME (2-mercaptoetanol)
IDGA (Imunodifusão em gel de ágar)
ICT (Imunocromatográfico)
PCR (Reação em cadeia polimerase)
IBOPE (Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística)
CCZ-SP (Centro de Controle de Zoonoses)
OMS (Organização Mundial da Saúde)
PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)
CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)
SUVIS (Supervisão de Vigilância em Saúde)
ONGs (Organizações não Governamentais)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras doenças que acometem os animais, a brucelose é uma das que merecem destaques por ser considerada uma zoonose. Caracterizando como uma doença de grande abrangência entre diversas espécies acometendo desde os animais domésticos, às criações pecuárias (bovina, bubalina, suína, caprina e ovina), exemplares silvestres, dentre outras ^{1, 2, 3, 4}.

No Brasil, a brucelose causa uma preocupação nos animais de produção, dado ao seu grande valor de mercado, pois a sua ocorrência afeta a eficiência reprodutiva destes animais, sendo relacionada a prejuízos econômicos. Além disso, sem se esquecer de seu potencial zoonótico, pela possibilidade de transmissão através da ingestão de produtos de origem animal. Devido à importância dessa doença nos animais de produção, principalmente os bovinos e bubalinos. Desta forma, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) elaborou programas sanitários com o objetivo de controle e erradicação da brucelose em animais de produção ^{4, 5}.

A brucelose também é capaz de acometer os cães, sendo assim, ocasionada pela espécie *Brucella canis*. Além de ser uma doença infectocontagiosa para caninos, é também considerada uma importante zoonose que pode acometer o homem, de modo que, coloque em risco a saúde humana ^{6, 1}. Apesar de tudo isso, mesmo com o potencial zoonótico comprovado desta espécie de *Brucella*, como também o registro de inúmeros artigos no âmbito científico, ainda há um desconhecimento de sua prevalência ^{7, 8, 1}.

Nos últimos anos, a população canina tem crescido cada vez mais, em um levantamento de dados elaborado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil tem 132,4 milhões de pets, correspondendo a 52,2 milhões de cães. São Paulo é o estado com maior número, concentrando a região sudeste com mais de 10. 550 milhões de cães (40%), a segunda maior região é o Sul (23%), seguida pelo Nordeste (20%), Centro-oeste (9%) e Norte (8%) ^{9, 10}. Desta forma, o vínculo afetivo entre seres humanos e os animais tem estimulado a criação de cães com finalidade comercial ¹¹.

Dada a forte interação da sociedade com os animais de companhia, faz com que a atenção à sanidade dos mesmos seja despercebida, deste modo, alguns canis

comerciais são deficientes nas boas práticas de criação de animais comercializados, dentre elas, a sanidade desses animais, assim como, o notável aumento de canis comerciais pode favorecer a disseminação da brucelose quando há deficiência no controle sanitário ¹².

Diferentemente de outras doenças das quais os cães podem ser imunizados, não há vacina para a prevenção da brucelose canina. Deste modo, são necessários outros meios de prevenção da doença, um deles, é o uso de testes laboratoriais para identificar os animais acometidos ^{7, 8, 12}. Existem diversas metodologias utilizadas como ferramenta de diagnóstico para a brucelose, que são baseadas em métodos diretos através do cultivo microbiológico e indiretos por meio de testes sorológicos ¹³.

Atualmente, encontram-se outros métodos propostos para detecção da infecção no cão, incluindo ensaios de imunocromatografia utilizado no presente estudo por apresentar sensibilidade de 90% e especificidade de 90,1 %, podendo ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da brucelose canina ^{[14], [15]}.

Outro método diagnóstico utilizado no presente estudo foi o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para detecção de anticorpos contra *B. abortus*, também conhecido como teste rosa de Bengala, instituído no ano de 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como forma de diminuição da incidência e prevalência de casos de brucelose e erradicação dessa zoonose em animais de produção no país, além de promover o aperfeiçoamento da pecuária nacional ^{16, 5}.

As características deste teste de triagem são sua alta sensibilidade e fácil execução. Trata-se de uma prova qualitativa (a leitura não indica títulos de anticorpos e sim a presença ou ausência de IgG no soro testado), sendo que, a maioria das amostras de animais bacteriologicamente positivos apresenta a reação a este método ^{16, 17}.

Para que haja um estudo prático da brucelose canina, foi utilizado como base neste presente trabalho, a realidade encontrada em um dos bairros localizados no extremo sul da cidade de São Paulo. A Ilha do Bororé, (apesar de se tratar de uma península da represa Billings, e não uma ilha), faz parte da Área de Proteção Ambiental Municipal Bororé-Colônia, criada pela Lei 14.162/06. Promover a proteção da diversidade biológica, de recursos hídricos e do patrimônio histórico da região,

bem como melhorar a qualidade de vida da população residente, foram razões para a criação dessa reserva ambiental ^{18, 19}.

A Ilha possui inúmeras nascentes, córregos e ribeirões que drenam água para as bacias Guarapiranga e Billings, contribuindo para a formação de mananciais e recursos hídricos que abastecem 30% da região Metropolitana de São Paulo. Não se encontrou um número oficial, mas segundo relatos sobre o Bororé, cerca de 8.000 pessoas habitam o bairro ¹⁹.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

Conhecida como uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, a brucelose é uma doença com distribuição mundial. Causada por bactérias Gram-negativas que se apresentam na forma de cocobacilos, intracelulares facultativas, sem capacidade de locomoção e de formar esporos. Logo, pertencem a família Brucellaceae e gênero *Brucella*^{17, 20, 21, 22, 1.}

A ocorrência do gênero *Brucella* foi relatada em diversas espécies, dentre elas, grande parte do número de afetados por esta doença são mamíferos. Cada espécie apresenta predileção por um hospedeiro preferencial, e por isso, são identificadas conforme seu hospedeiro, bem como suas características morfológicas, propriedades metabólicas, sorotipagem e fenotipagem. Contudo, algumas espécies apresentam elevado risco de transmissão ao homem, motivo pelo qual se dá a importância da brucelose como zoonose^{22, 20, 21, 17.} O subcomitê de *Brucella* recomenda a classificação do gênero e subsequentemente a espécie acometida, descrevendo, assim, as principais espécies e seus respectivos hospedeiros como: *B. abortus*^{23, 24,} formada por biovars 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, causadora da brucelose bovina e bubalina (sendo de maior importância no Brasil devido a perdas econômicas advindas da queda dos índices de produtividade, perda de animais, além do depreciação do valor comercial), *B. melitensis*^{25,} constituída pelos biovars 1, 2 e 3, acomete caprinos, ovinos e camelos; *B. ovis*^{26,} ocasiona epididimite em ovinos (no entanto, não é patogênica para os humanos)^{27, 22, 27, 28, 3.} A *B. suis*²⁹ possui os biovars 1, 2, 3, 4 e 5, sendo que os biovars 1 e 3 acometem suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*), enquanto o biovar 2 infecta aos suínos selvagens (*Sus scrofa scrofa*), o biovar 4 foi descrito no acometimento de renas e caribus (*Rangifer tarandus* e subespécies) e por último há relatos do isolamento do biovar 5 em roedores silvestres^{30.} A *Brucella neotomae* foi descrita em roedores

silvestres da espécie *Neotoma lepida* ^{31, 28}, sendo que atualmente foi relatado infecções em humanos ³².

Ainda não foi identificado o hospedeiro de manutenção da *Brucella inopinata*, contudo, é relatada a sua presença em roedores, anfíbios e humanos ^{33, 34}. Em algumas espécies de anfíbios, com quadros patológicos severos que resultaram alta mortalidade, foram isoladas cepas brucélicas ³⁵. Recentemente, está sendo estudado a descoberta da *Brucella maris* que acomete mamíferos marinhos, demonstrando, conforme o tempo, cada vez mais a disseminação desta doença em diversas espécies, bem como o seu alcance ecológico ³⁶.

Algumas espécies do gênero *Brucella* podem provocar infecções zoonóticas, sendo que as mais citadas frequentemente são: *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* (por não ocorrerem relatos, o Brasil é considerado indene de infecções por *B. melitensis*, sendo descrita respectivamente no Mediterrâneo e Oriente Médio). A *Brucella canis*, responsável por causar a brucelose canina, acomete principalmente os cães, contudo possui capacidade de infectar os seres humanos, comprovando seu potencial zoonótico. Entretanto a sua relevância ainda é pouco conhecida quando comparado com a *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* ^{20, 22}.

As bactérias do gênero *Brucella* mesmo que permaneçam no ambiente não se multiplicam nele, sendo assim, medianamente sensíveis aos fatores ambientais. O aumento da temperatura, luz solar direta, dessecação, diminuição da umidade e utilização de desinfetantes comuns são fatores que diminuem a sua resistência ambiental (quadro 1), outro método eficiente para destruição da *Brucella* spp é a pasteurização, como também as radiações ionizantes. Tanto em tecidos enterrados que estão contaminados quanto em cadáveres, a *Brucella* spp pode resistir viva no período de um a dois meses quando submetida em condições climáticas de temperatura fria, no entanto, morrem em vinte e quatro horas ao serem expostas em regiões quentes ou até mesmo no verão ³.

Quadro 1 – Resistência de *Brucella* spp. em determinadas condições ambientais.

(Continua)

Condição Ambiental	Tempo de Sobrevivência
Luz Solar Direta	4-5 horas

(Conclusão)

Solo	Seco	4 dias
	Úmido	65 dias
	Baixas temperaturas	151-185 dias
Fezes		120 dias
Dejetos	Esgoto	8-240\700 dias
	Altas temperaturas	4 horas – 2 dias
Água	Potável	5-114 dias
	Poluída	30-150dias
Feto à sombra		180 dias
Exsudato uterino		200 dias

Adaptado de BRASIL (2006)

As bactérias do gênero *Brucella* se diferenciam em dois grupos, por apresentarem particularidades em suas características antigênicas. São denominadas de *Brucella* com morfologia colonial lisa, correspondendo a *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, e *Brucella* com morfologia colonial rugosa (rugosa estriada ou mucóide) sendo *B. ovis* e *B. canis*. As paredes da *B. ovis* e *B. canis* apresentam semelhança, desta forma, utiliza-se o antígeno de *B. ovis* para diagnosticar a infecção por *B. Canis*, e vice-versa^{37, 3.}

Deste modo, a classificação morfológica da *Brucella* é baseada na composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) de sua parede celular. Assim, o LPS presente no grupo das lisas é composto de lipídeo A, núcleo oligossacarídeo e cadeia O, produzindo no hospedeiro uma resposta antigênica exacerbada, tornando-a, além disso, patogênica. Enquanto nas estirpes rugosas encontra-se somente o lipídeo A e o núcleo oligossacarídeo^{38.} Portanto, o LPS é o antígeno responsável pela resposta imunitária, sendo um dos fatores de virulência da bactéria^{39, 40.}

Uma das medidas tomadas pela Organização Internacional de Saúde Animal (OIE)^{41.} é a notificação obrigatória de animais infectados por *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis* (não foram encontrados relatos de casos de infecção no Brasil), e suínos acometidos por *B. suis*. Quanto à ocorrência de acometimento de *Brucella* spp. em animais silvestres, existem poucos relatos devido a escassez de informações^{3, 42.}

Logo, foi estabelecido pelo MAPA o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), ao reconhecer a importância dessas doenças no âmbito da saúde pública e saúde animal. Além de prejuízos econômicos e sociais, devido ao impacto causado sobre a produtividade dos rebanhos, são zoonoses que apresentam riscos à saúde humana^{3, 4.}

A instituição deste programa sanitário estabeleceu um conjunto de medidas de estratégias e normas para combate, controle e prevenção da brucelose. Assim, determinou-se propostas técnicas, dentre elas, a utilização de testes oficiais para métodos de diagnóstico através da padronização das seguintes provas: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL), sendo determinados como testes de triagem; 2-Mercaptoetanol (2-ME), Soroaglutinação em Tubos (SAT) e Fixação de Complemento (FC) considerados como testes confirmatórios³.

O sacrifício sanitário para animais positivos, certificação de propriedades livres, controle do trânsito de animais destinados à reprodução, como também a capacitação de médicos veterinários habilitados pelo PNCEBT são outras medidas adotadas neste programa. No Brasil, determinou-se a implantação obrigatória da vacinação de bezerras com idade entre três a oito meses³.

As vacinas mais utilizadas no controle da brucelose estabelecida pela OIE são as vacinas atenuadas, sendo que as mais empregadas são: a B19 para fêmeas jovens e a RB51 não indutora de anticorpos aglutinantes, empregada para a imunização de fêmeas na faixa etária superior que oito meses, por não interferir no diagnóstico sorológico da doença. Não é recomendada a administração da vacina em machos e gestantes, devido a possibilidade de ocasionar orquite, além de abortamento se administrada durante a gestação. A vacina pode infectar o homem e provocar a doença. Por esse motivo, são fundamentais as medidas de proteção individual, descarte correto de seringas e frascos de vacinas^{3, 4, 43}.

A brucelose canina, foi descrita inicialmente em 1966 nos Estados Unidos da América (EUA), no período em que alguns estados americanos apresentavam a ocorrência de abortamentos em canis comerciais da raça Beagle. Dessa forma, ao coletar amostras de tecidos fetais e placentários foi isolado uma bactéria com particularidades diversas que indicavam pertencer ao gênero *Brucella* spp. após estudos, verificou-se que algumas características bioquímicas, sorológicas e de cultivo, eram distintas das demais espécies relatadas, desta forma, foi denominada *B. canis*^{44, 45, 17, 1}.

Devido às medidas de controle nos últimos anos, a literatura aponta que a incidência de brucelose nos animais e no homem vem diminuindo, entretanto afirma que as condições climáticas, densidade populacional, são fatores que favorecem a permanência do agente na América Latina^{1, 46}. Além de que, no Brasil, não há

notificação obrigatória para *B. canis*, acreditando-se assim, que o número de casos sejam maiores do que os que estão descritos na literatura científica^{47, 14, 12.}

2.2 TRANSMISSÃO

Os cães podem ser acometidos por diversas espécies do gênero *Brucella*. O cão doméstico é considerado como principal reservatório da *B. canis*, entretanto, canídeos silvestres podem ser acometidos e raramente os gatos. Além da *B. canis*, há também relatos de infecções esporádicas por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, entre outras. No Brasil, foram descritos casos de *B. abortus* em cães criados em regiões de áreas rurais onde havia a ocorrência de brucelose bovina, embora os cães sejam menos suscetíveis a *B. abortus* e *B. suis*^{44, 7, 37, 49.}

A eliminação do agente pelo sêmen torna a transmissão venérea tanto para o macho quanto para a fêmea, sendo, portanto, a principal via de infecção. Os cães podem se infectar frequentemente por outras portas de entrada, como, por exemplo, as mucosas oronasal e conjuntival^{7, 49.} A *B. canis* também é transmitida pelo contato com tecidos fetais abortados, descargas vaginais do parto ou do abortamento. As descargas vaginais de fêmeas com brucelose canina durante o estro também apresentam altas concentrações de micro-organismos. A urina é outra importante via considerada como meio de transmissão deste agente^{37.}

Além disso, a bactéria pode ser detectada no sangue. Em alguns relatos, foram encontrados em fêmeas lactantes devido à excreção de *B. canis* pelo leite, mas, é apresentada como fator de menor importância, uma vez que os filhotes geralmente se infectam por via intra-uterina, uma vez que existe a possibilidade de transmissão vertical^{49.} Em contrapartida, outros autores consideram a importância do leite como via de transmissão e disseminação da bactéria no meio ambiente^{44.} Foi descrito o isolamento de grandes quantidades de bactérias nas primeiras seis a oito semanas pós-infecção no sêmen de cães acometidos por *B. canis*, devido à presença das mesmas na próstata e epidídimo, no entanto, concluiu-se que a eliminação intermitente do organismo é em baixas concentrações, sendo notada por até 60 semanas pós- infecção, permanecendo por até dois anos^{7, 20.}

O manuseio de materiais utilizados na reprodução animal, tais como vaginoscópio, seringas contaminadas, práticas de inseminação artificial, bem como transfusão sanguínea, utilizando sangue ou sêmen de animais infectados, é frequentemente relatada como um meio de transmissão por fômites^{20, 1}. Após a interrupção da bacteremia, e apresentar-se assintomáticos os cães soropositivos podem ainda assim, transmitir o agente para outros animais susceptíveis⁴⁶.

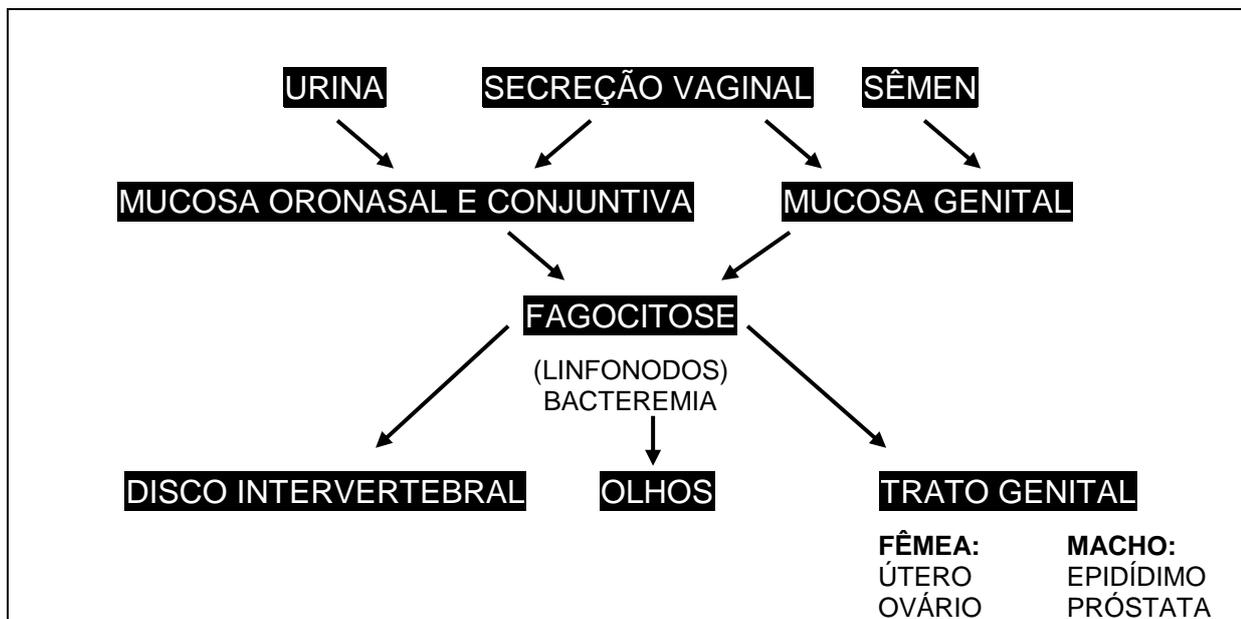
2.3 PATOGENIA

Posteriormente, os cães adquirirão a infecção através de um dos meios da via de transmissão, como descritos acima, seja por via oral, nasal, ocular ou venérea. Logo após a entrada da bactéria no hospedeiro as células do sistema mononuclear fagocitário, aderem-se ao agente, o mesmo é fagocitado, por apresentar a característica de ser um organismo intracelular facultativo, o agente infeccioso multiplica-se e permanece interiorizado na célula de defesa^{49, 1, 44}.

Deste modo, é transportado para os linfonodos regionais, promovendo uma linfadenopatia periférica. Logo após, ocorre à fase de bacteremia, devido à bactéria atingir a circulação sanguínea no interior dos macrófagos, disseminando para todo o organismo do hospedeiro, tendo também como preferência tecidos ricos em esteróides gonadais dos órgãos reprodutivos, colonizando assim, órgãos ricos em sistema mononuclear fagocitário, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea^{50, 49, 44, 1}. Outros locais descritos são os rins, meninges, câmara anterior dos olhos e discos intervertebrais⁷.

A fase de bacteremia pode iniciar por cerca de uma a quatro semanas após a infecção, persistindo de seis a 64 meses⁵¹. A princípio, após a infecção, além da resposta imune celular, os anticorpos (imunidade humoral), da classe IgM são produzidos, e deste modo a sua presença indicam infecção recente. Subsequentemente nos animais infectados por *Brucella* os níveis de IgM diminuem de forma rápida. Entretanto, ocorre a produção persistente da classe de IgG. Sobretudo a principal subclasse de anticorpo existente no soro sanguíneo dos animais é a IgG1, permanecendo assim, por longos períodos indicando uma infecção de caráter crônico^{49, 7, 52}.

Quadro 2 – Patogenia da brucelose canina através das vias de transmissão da doença.



Fonte: Adaptado de MÉLO (2013)

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A *B. canis* é conhecida como uma das doenças que podem causar distúrbios reprodutivos. Deste modo, abortamentos consecutivos e morte embrionária são os principais sinais clínicos observados em fêmeas, enquanto em machos são, frequentemente, notados orquite e epididimite, além de infertilidade em ambos os sexos^{12, 7, 1}. Por ser uma bactéria que infecta preferencialmente o útero de fêmeas prenhes colonizando as células epiteliais placentárias, desta forma resultam em retenção de placenta, reabsorção fetal, em alguns casos podem levar a gestação a termo, mas apresentar o nascimento de filhotes fracos que entram em óbito em poucos dias, como também gerar natimortos, além de corrimento vaginal e subfertilidade^{8, 12, 37, 1}.

As cadelas não prenhes infectadas por *B. canis* frequentemente apresentam infecções inaparentes, no entanto, podem eliminar a bactéria pela urina e secreções vaginais por tempo variável³⁷. Os fetos abortados podem apresentar manifestações

clínicas variadas como broncopneumonia, miocardite, nefrite, hemorragia focal, hepatite e linfadenite ^{12, 13, 37, 14, 15.}

Na mesma proporção, a *B. canis* pode causar prostatite nos machos, devido à infecção causada na próstata do cão, pode-se isolar maior quantidade de bactéria na urina. São encontradas, frequentemente, atrofia testicular, motilidade espermática fortemente reduzida além de alterações de peça intermediária, bem como, presença de gotas citoplasmáticas distais ^{8, 12, 37, 7.} A dermatite escrotal é outra alteração decorrente das constantes lambeduras causadas pela dor e desconforto da epididimite, podendo haver em alguns casos a colonização por *Staphylococcus aureus* ^{7, 8.} Conseqüentemente, as lesões que a *B. canis* ocasiona ao sistema reprodutivo, torna o prognóstico reprodutivo desfavorável ^{12.}

Na maioria dos casos, em cães não reprodutores a infecção por *B. canis* pode ocorrer de maneira assintomática, tornando-se assim, a principal fonte de infecção e disseminação da doença na população animal e humana. Pode ocorrer de forma discreta nesses animais linfonodomegalia ^{53, 37, 1.} As demais manifestações de ordem não reprodutiva são descritas com uma ocorrência menor, entretanto, os animais acometidos podem ainda apresentar glomerulonefrite, uveíte, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e osteomielite. Ainda assim a discoespondilite, relatada em diversos estudos de casos na clínica de pequenos animais, é um diferencial para brucelose canina ^{14, 12, 48, 1.}

2.4 IMPORTÂNCIA

A infecção por *B. canis* ocasiona excepcionalmente graves prejuízos aos criadores de cães, devido perdas econômicas nos canis comerciais em decorrência aos problemas reprodutivos, remoção de matrizes do plantel e perda do patrimônio genético ^{14, 12, 20, 1.} Em criações comerciais, em vista da lucratividade, geralmente o número de animais criados de forma confinada é relativamente grande. Alguns proprietários preocupados com a obtenção de lucro associado com a falta de conhecimento das medidas de manejo sanitário introduzem animais portadores da doença em seus plantéis, sem controle. Na maioria das vezes, os animais infectados

por *B. canis* podem ser assintomáticos, contribuindo imediatamente para a disseminação da enfermidade na população de animais saudáveis nos canis ¹².

Deste modo, os fatores que contribuem para a disseminação dessa doença infectocontagiosa são a falta de medidas de controle como a quarentena de animais recém adquiridos no plantel, exames dos reprodutores que comprovem a sanidade dos mesmos, bem como, o empréstimo de reprodutores entre os canis comerciais. Além do mais, as medidas de higiene, muitas vezes, são insuficientes, favorecendo a transmissão da doença. Diferentemente da produção pecuária leiteira ou de corte, tais fatores, como a falta de regulamentação para controle desta zoonose, podem gerar determinado impacto em saúde pública, uma vez que, é permitido a comercialização de cães infectados ¹².

Além das perdas econômicas diretas descritas em canis comerciais, estimou-se a diminuição de 25% na bovinocultura de leite e de corte, como também a redução de 15% na produção de bezerros, demonstrando ainda que, em cada cinco vacas acometidas pela doença, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril. Entre as perdas indiretas, deve-se ressaltar a infecção em humanos, que quando não tratada a forma aguda da doença, seu curso crônico resulta em vultuosas perdas econômicas ³.

A brucelose foi descrita inicialmente em humanos no ano de 1859 por Marston, na Ilha de Malta (por isso denominada febre de Malta), no momento em que pacientes apresentaram um quadro de febre intermitente seguido por óbito. Anos mais tarde, em 1913 foi relatado o primeiro caso de brucelose humana no Brasil, sendo que no ano seguinte pela primeira vez, realizou-se o diagnóstico da brucelose bovina no estado do Rio Grande do Sul ⁵⁴.

No homem, a transmissão pode ocorrer por via digestiva, através do consumo de produtos e derivados do leite não pasteurizados, produtos lácteos contaminados, como também, carne crua ou mal passada. Além da transmissão por alimentos, a brucelose pode ser transmitida pelo contato direto com secreções de animais infectados como descargas vaginais, restos placentários, carcaças, urina e fetos. As vias inalatória, congênita e venérea também são descritas como outros possíveis meios de transmissão. Embora sejam consideradas raras, em transfusões sanguíneas e o transplante de órgãos podem ocorrer. Há, ainda, a inoculação acidental do patógeno através da vacinação animal para *Brucella abortus*. O contato com animais infectados, como gado bovino e bubalino, caprinos, ovinos, suínos,

equinos e caninos, entre outros, podem gerar fatores de exposição e risco, no ambiente de trabalho, atingindo principalmente trabalhadores rurais, operários de frigoríficos, açougues, matadouros, médicos veterinários e laboratoristas, que devido a sua profissão, apresentam um contato maior com esses animais ^{27, 12, 20, 1, 55}. Outro fator de risco se dá pelo abate clandestino de animais, uma prática condenável que ocorre em diversas localidades do País, representando desta forma, graves fatores de risco pela exposição ao agente infeccioso ¹.

A literatura aponta diversos relatos e formas das quais o homem contraiu brucelose, e uma dessas formas, como citado, é o ambiente de trabalho, tornando a brucelose uma doença ocupacional, citada na lista de doenças relacionadas ao trabalho, segundo a Portaria nº 1.339/1999, do Ministério da Saúde, e considerada uma das responsáveis por incapacitar ou diminuir o rendimento do colaborador ⁵⁵. Os sinais clínicos descritos em humanos variam, alguns podem ser confundidos com outras doenças, dificultando, assim, o diagnóstico. No entanto, as manifestações clínicas podem ser brandas ou severas, as principais são: febre intermitente, sudorese intensa, perda de peso, cefaleia, cansaço fácil, náuseas e linfadenomegalia. Há relatos de casos mais graves, como icterícia, endocardite, mialgia, artrite, osteomielite, hepatite, entre outros ^{39, 40, 43, 1, 48}.

Em relação à infecção por *B. canis* no homem, há dados da sua ocorrência disponíveis através de relatos de casos em publicações científicas. Quanto à preocupação da brucelose canina e seu potencial caráter zoonótico, os proprietários e manipuladores dos cães acometidos podem adquirir a infecção pelo contato com esses animais ou através de material contaminado por *B. canis*, como também, através dos acidentes em laboratórios devido à manipulação direta com a *B. canis* ⁴³, ¹.

Infelizmente, o tratamento dos cães infectados apresenta um elevado custo sendo questionável, devido ao uso de antibióticos por intervalos prolongados com altas doses, das quais normalmente não são obtidos resultados satisfatórios por conta da *B. canis* ser um micro-organismo intracelular facultativo, logo, todos os animais acometidos devem ser considerados como portadores por todo período de sua vida. Desta forma, a esterilização e a associação de antimicrobianos nestes cães são indicadas como algumas das medidas de tratamento e profilaxia em determinados casos específicos, como em cães de alto valor afetivo ou econômico. Entretanto, em canis comerciais, os animais positivos devem ser retirados da

reprodução, sendo preconizado como um método eficaz no controle, a eutanásia de cães reprodutores soropositivos para *B. canis*, com objetivo de eliminar a infecção do agente nos canis ^{27, 12, 20, 1, 48, 49, 14, 19.}

2.5 EPIDEMIOLOGIA

A ocorrência de brucelose canina vem sendo evidenciada no estado de São Paulo, com uso de métodos sorológicos e microbiológicos (quadro 3) em cães errantes, oriundos de situação de abandono e animais de canis comerciais ^{12, 53, 14, 56, 47, 43, 51.}

Quadro 3 - Ocorrência da Brucelose canina na cidade de São Paulo com o emprego de métodos sorológicos e microbiológicos.

Autores	Número de Animais	Procedência dos Cães	Positivos	Diagnóstico Utilizado
Sandoval et al., 1976	221	Errantes	8 (3,61%)	SAL
Larsson et al., 1981	27	Canis e Errantes	5 (18,51%)	SAL
			3 (11,12%)	HEMOCULTURA
Cortes et al., 1988	3386	Canis e Errantes	254 (7,5%)	IDGA
Keid et al., 2004a	171	Canis comerciais	58 (33,91%)	IDGA
			24 (14,03%)	HEMOCULTURA
Keid et al., 2004b	139	Canis Comerciais	5 (41%)	HEMOCULTURA
Keid et al., 2017	753	Canis comerciais	157 (20,90%)	HEMOCULTURA

Fonte: MÉLO (2013); KEID (2017)

Legenda: SAL: Soroaglutinação lenta. IDGA: Imunodifusão em gel de Agar.

2.6 DIAGNÓSTICO

Existem diversas metodologias utilizadas como ferramenta de diagnóstico para a brucelose, baseadas em métodos diretos com o objetivo de identificar o agente, através do cultivo microbiológico, ou pela detecção de anticorpos, por meio de testes sorológicos, sendo este, um dos métodos indiretos ¹². O cultivo bacteriológico em diversos materiais biológicos, como o sêmen, urina, secreções vaginais e tecidos, já foram utilizados para diagnosticar o agente ^{53, 12}.

Algumas medidas importantes devem ser tomadas com o material coletado podendo elas influenciar na presença da bactéria nas amostras. São elas, a coleta, realizada de maneira asséptica, a fase da infecção e o refrigeração do material. Se o animal foi previamente á obtenção das amostras, tratado com antimicrobianos, o isolamento bacteriano pode ser prejudicado. Como a sensibilidade do cultivo microbiológico é variável, a não detecção do agente, não descarta totalmente a presença dele ^{13, 37, 14}.

Apesar de possuir alta especificidade o cultivo microbiológico é demorado, pois as bactérias apresentam crescimento lento em cultivo, além de correrem o risco de serem contaminadas por outros micro-organismos. Risco este, ao qual também estão sujeitos os seus manipuladores. O desenvolvimento de diferentes testes sorológicos orienta-se pela observação do comportamento das imunoglobulinas. Desta forma, outro método utilizado no diagnóstico da brucelose canina são os testes sorológicos, que identificam nos soros sanguíneos dos animais infectados, alguns anticorpos específicos, sendo os principais testes: soroaglutinação rápida (SAR) ⁸, soroaglutinação lenta (SAL) ²⁰, soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol (SAR-2ME), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) ²⁴, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ³⁷, por fim, atualmente, encontra-se outros métodos propostos para detecção da infecção no cão, incluindo ensaios de imunocromatografia (ICT) ⁵⁷.

Outro método utilizado como alternativa do cultivo microbiológico é a reação em cadeia polimerase (PCR), devido à presença de maior sensibilidade em detectar quantidades reduzidas da bactéria, tendo como vantagem alta especificidade e rapidez, por não demonstrar a necessidade da manipulação de culturas de *Brucella*,

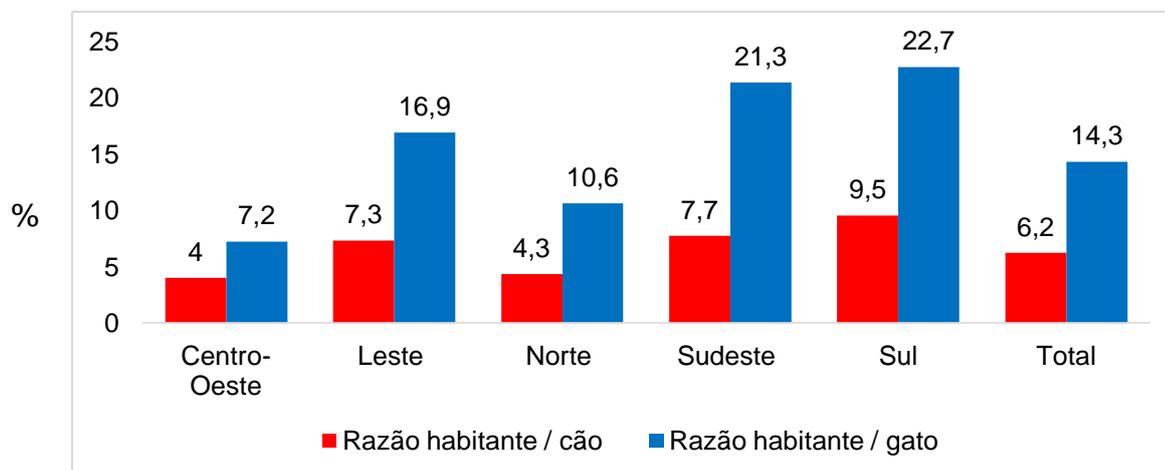
além de não ter a dependência da viabilidade do micro-organismo e não apresentar intercorrências com contaminantes ¹².

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta a segunda maior população mundial de cães. Em pesquisa realizada pelo IBOPE (Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística), constatou-se que 59% da população brasileira apresentam algum tipo de animal de companhia, sendo que 44% são cães ¹⁰. Na medida que os anos foram passando, a domesticação de cães e gatos tornou a convivência do homem cada vez mais próxima e afetuosa com os animais. Atualmente para o Tribunal de Justiça de São Paulo, animais são membros da família e já podem ser registrados em cartório com o sobrenome de seus tutores ⁵⁵.

O inquérito de saúde ISA-Capital 2015 ⁵⁸ realizou um levantamento estimado da população de cães e gatos supervisionados no Município de São Paulo, de acordo com a proporção de animais castrados e vacinados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-SP), apresentando os resultados através de gráficos descritos a seguir.

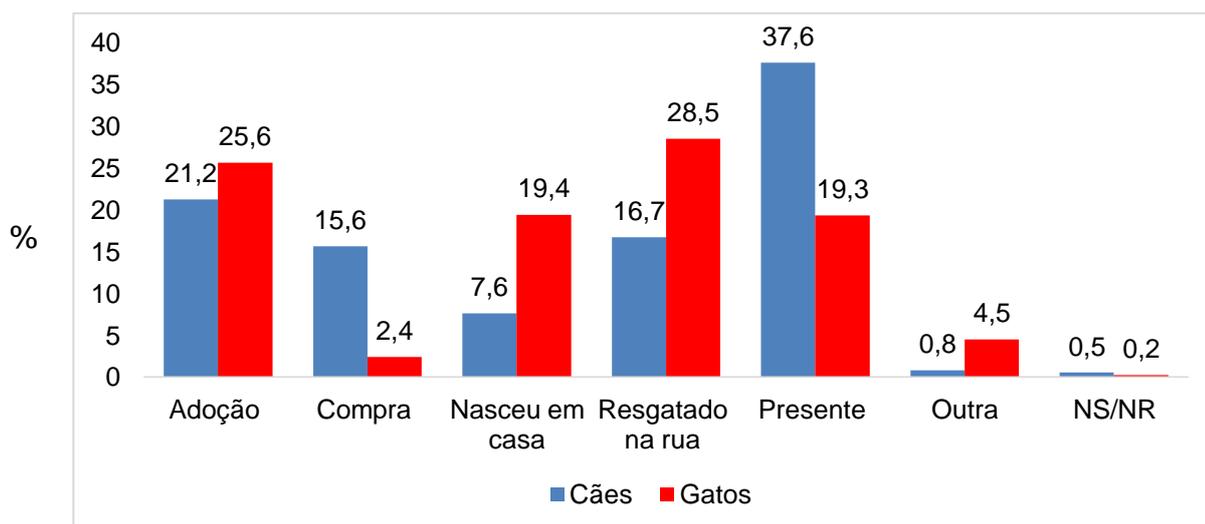
Gráfico 1 – Razão de habitantes para cada cão ou gato, segundo CRS. MSP, 2015



Fonte: Adaptado de ISA (2015)

Conclui-se que em 43% dos domicílios urbanos do município de São Paulo encontram-se cães ou gatos: em 28,6% apresentam somente cães, enquanto 7,7% apenas gatos e em 6,7% ambas as espécies. A população de cães é estimada em 1.874.601 enquanto de gatos em 810.170, indicando razão *homem: cão*= 6,2 e *homem: gato*=14,3⁵⁸.

Gráfico 2 – Forma de aquisição dos cães e gatos no Município de São Paulo, segundo CRS. MSP, 2015.



Fonte: Adaptado de ISA (2015)

Como no gráfico citado acima são inúmeros os motivos que levam as pessoas a adquirirem animais de companhia, em cães a forma mais expressiva se dá por meio de presente (37,6%), de forma secundária, através da adoção (21,2%) e assim por diante o resgate na rua (16,7%).

A forma de aquisição de cães influencia em diversos fatores, de acordo com dados disponibilizados pela *Fédération Cynologique Internationale* o estímulo da criação de canis com finalidade comercial está cada vez mais crescente⁵⁹. Do mesmo modo o mercado de pets no Brasil é o terceiro do mundo em faturamento, sendo esperado alcançar R\$ 20 bilhões até o ano de 2020¹⁰.

Embora seja notável o crescente número da população canina, uma parcela destes animais encontra-se em situação de abandono. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o cenário de cães abandonados é uma realidade nacional, existem aproximadamente 30 milhões de animais abandonados

no Brasil. Destes, 10 milhões correspondem aos gatos, em contrapartida o número de cães soma aos 20 milhões. Desta forma tal condição de cães e gatos errantes favorecem a disseminação de doenças zoonóticas, colocando em risco a saúde humana⁵⁵.

Testes sorológicos são utilizados como meio de diagnóstico para detectar anticorpos específicos anti-*Brucella*, por serem de fácil execução, baixo custo e rápidos^{1, 12, 13}.

Em razão disso, existe uma grande diversidade de testes sorológicos para o diagnóstico desta doença, entretanto, a literatura aponta que testes sorológicos disponíveis para diagnosticar *Brucella canis*, carecem de determinadas particularidades, como sensibilidade diagnóstica uma vez que após a realização dos mesmos, os resultados sorológicos apresentam-se negativos^{12, 13, 14}.

Atualmente, uma das técnicas utilizadas para detecção de *Brucella canis* é o Imunoensaio Cromatográfico (ICT)¹². KEID *et al.* (2015) realizaram um estudo comparativo para avaliar o desempenho de diversos testes sorológicos. Para tal, utilizaram amostras biológicas de 102 cães oriundos de canis comerciais do Estado de São Paulo, sendo que os mesmos foram previamente considerados infectados, de acordo com resultados positivos apresentados após o uso da hemocultura e/ou a reação em cadeia polimerase (PCR), indicando a infecção ativa e, como consequência, um risco iminente de disseminação de *Brucella*^{12, 13}.

Deste modo ao comparar as técnicas de soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação rápida com 2-Mercaptoetanol (SAR-2ME) e imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ICT, o ICT apresentou-se eficiente no comparativo de testes realizados por KEID *et al.* (2015), ao apresentar em seus resultados alta sensibilidade e especificidade diagnóstica quando comparado ao SAR, SAR-2ME e IDGA.

O uso do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), segundo teste empregado para detecção de *Brucella abortus* neste trabalho, foi devido à presença de propriedades com bovinos e seu estreito contato de cães errantes no local, podendo ser um meio de transmissão deste agente entre as espécies³. Em vista do exposto, considerando a importância da brucelose canina como uma doença infectocontagiosa, que ocasiona problemas sanitários e perdas econômicas para criadores em canis comerciais¹, além da escassez de estudos epidemiológicos deste agente na população canina da zona sul do município de São Paulo, o

presente trabalho, bem como os métodos de diagnósticos apresentados, foram selecionados visando o levantamento e pesquisa de dados acerca da ocorrência de *B. canis*, bem como *B. abortus* em cães do referido município.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou verificar a frequência da brucelose canina em cães atendidos nas campanhas de controle populacional animal na Ilha do Bororé, localizada no extremo sul do município de São Paulo.

5 MATERIAIS E MÉTODO

Os procedimentos do presente estudo foram dispensados da análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santo Amaro, parecer nº 80/2015, sendo realizada de acordo com as normas éticas.

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

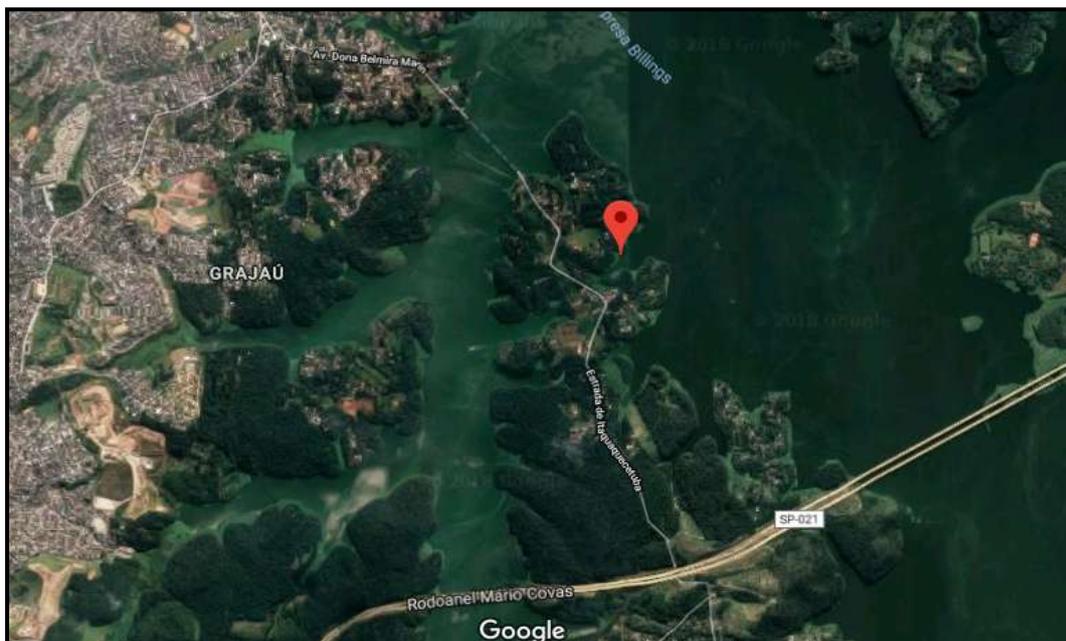
O estudo foi realizado com amostras de soro canino, pertencentes a um banco de soros, colhidas durante campanhas de esterilização cirúrgica realizadas na Ilha do Bororé, área de abrangência da Supervisão de Vigilância em Saúde (SUVIS) Capela do Socorro.

A Ilha do Bororé é configurada por três ambientes distintos e facilmente identificáveis: perímetro urbano com asfalto, comércios e grande número de habitações com loteamentos irregulares, onde há a presença de animais domésticos; área rural com pequenas propriedades, sendo que em algumas delas há a criação de bovinos, e, por fim, uma grande porção de Mata Atlântica (figura 2), onde há relatos da presença de animais silvestres ^{18, 19}.

Na região há um elevado número de animais em situação irregular nas ruas, pois, dada a sua proximidade com o grande perímetro urbano da capital, a região tornou-se um reduto para quem procurar um local afastado e sigiloso para abandonar animais. Muitos se aproveitam da balsa para atravessar a represa, abandonar o animal e depois voltar novamente pela balsa de modo que o animal não possa segui-lo de volta para casa ¹⁸.

Diante disso a prefeitura em parceria com Organizações não Governamentais (ONGs) tem trabalhado em conjunto com o intuito de contornar essa situação de abandono e acúmulo de animais. Uma das formas propostas é o controle populacional animal através da esterilização de cães e gatos, como também, o encaminhamento destes animais errantes para adoção. Essas configurações únicas encontradas na Ilha do Bororé podem contribuir para a propagação de zoonoses, como a brucelose ¹⁹.

Figura 1 – Divisão do bairro Grajaú com a Ilha do Bororé.



Fonte: Adaptado de GOOGLE MAPS (2018)

Figura 2 – Delimitação urbana com preservação de Mata Atlântica na Ilha do Bororé



Fonte: Adaptado de GOOGLE MAPS (2018)

5.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS E EXAMES LABORATORIAIS

As amostras foram colhidas com o consentimento dos proprietários de cada animal, sendo todos os procedimentos submetidos à autorização por escrito através do Termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO). As colheitas foram efetuadas no período de agosto de 2015 a junho de 2016.

As amostras de sangue foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, com agulha hipodérmica 30x7 mm, seringa de 5 mL em tubos sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro, que foi aliquotado e armazenado em micro tubos plásticos a 20°C negativos até o momento de sua análise.

5.3 PROVAS SOROLÓGICAS

As amostras foram analisadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade Santo Amaro.

5.3.1 Imunoensaio Cromatográfico (ICT)

Foi utilizado o ICT realizado por meio do *kit* diagnóstico *Alere Brucelose Canina Ac Teste kit*® (produzido por: *Bionote* – distribuído por: ALERE/AS), em 50 amostras para a detecção qualitativa do anticorpo (IgG), contra *Brucella canis*. A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante.

O *kit* é composto por cassete-teste, tubo de amostra contendo tampão diluente, tubos capilares de 10 µL (figura 4). Todos os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente. Deste modo, após o preparo e a separação dos materiais, no momento do uso, removeu-se o cassete da embalagem de alumínio, sendo colocado

sobre uma superfície plana, seca e limpa de uma bancada de laboratório à temperatura ambiente.

O dispositivo do teste possui uma letra “C” e uma letra “T”, na superfície do cassete indicando a Linha de Controle e a Linha Teste, respectivamente. Tanto a Linha Controle “C” quanto a Linha Teste “T”, não são visíveis na área de teste antes da aplicação da amostra.

A linha C é usada para o controle de procedimento, esta linha deve sempre aparecer se o procedimento do teste for realizado corretamente e se os reagentes do teste estiverem funcionando. Foi adicionado 10 μ L de soro no orifício do cassete e, logo em seguida, acrescentadas duas gotas do tampão diluente (aproximadamente 80 μ L). No momento em que o teste começou a reagir, foi observado uma cor rosa se movendo através da janela de resultado no centro do dispositivo do teste. O resultado do teste do teste é interpretado após 20 minutos. Nos casos em que a linha rosa não é visualizada, após o período de um minuto, deve-se adicionar mais uma gota do tampão no orifício do cassete.

A interpretação dos resultados foi baseada de acordo com a formação das linhas coloridas em seus respectivos lugares. Assim sendo, o cassete teste formado apenas com a linha-controle (letra C), conforme a figura 5 (a) indica que o resultado foi não reagente. Na área de teste (letra T), o complexo anticorpo-conjugado se liga aos antígenos da bactéria, formando uma linha colorida, como na figura 5 (b), indicando que o resultado foi reagente, ou seja, foram detectados anticorpos (IgG) anti- *B. canis* na amostra testada..

O conjugado não ligado ao anticorpo e o excesso do complexo imune continua a migração ao longo da membrana de nitrocelulose em direção à área de controle (letra C), onde são capturados por anticorpos anti-imunoglobulina, formando outra linha colorida, a linha controle é formada, independentemente de a amostra ser positiva.

Figura 3 – Sequência do procedimento utilizado no *kit* diagnóstico *Alere Brucelose Canina Ac Teste kit*®.



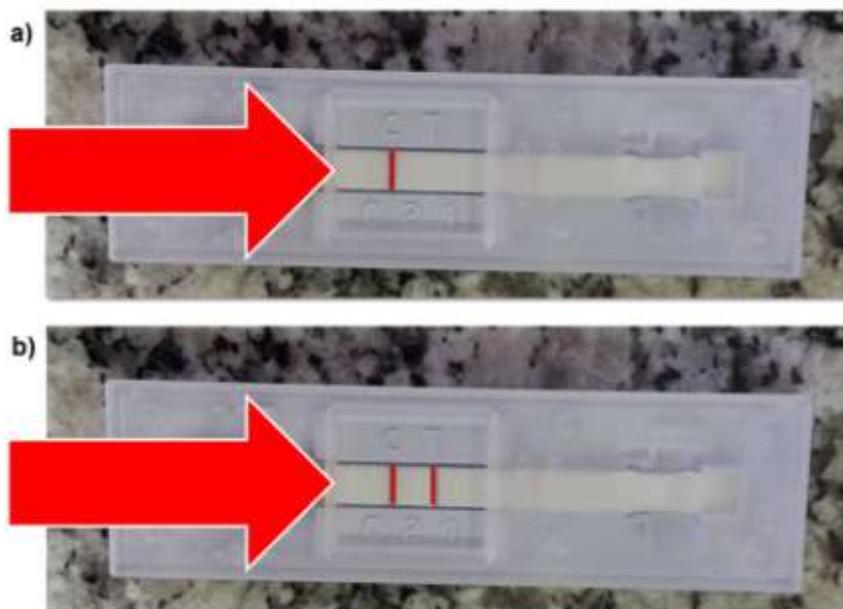
Fonte: Ficha técnica *Alere Brucelose Canina Ac Test Kit*® (2017)

Figura 4 – Componentes do kit imunocromatográfico: cassete-teste, tubo de amostra contendo tampão diluente, tubos capilares de 10 µL.



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

Figura 5 – Resultados dos resultados do teste imunocromatográfico. A presença de apenas uma linha-controla formada no cassete-teste, identifica que o teste é não reagente, ou seja, a amostra é negativa (a). Cassete-teste com linha-controla formada e linha-teste formada, confirmando resultado reagente para *B. canis* (b).



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

5.3.2 Teste Do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

Outro método diagnóstico utilizado no presente estudo foi o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), também conhecido como teste rosa de Bengala para detecção de anticorpos contra *B. abortus*.

A técnica foi realizada seguindo os procedimentos estabelecidos no Regulamento do PNCEBT, o AAT é uma prova de aglutinação rápida onde se usa um antígeno tamponado corado com rosa de bengala a um pH de 3,65.

O material utilizado para a realização desta prova foi composto por um antígeno para o AAT, uma pipeta de 30 μ L de volume ajustável, ponteiras, uma placa de vidro delimitada com quadrados de 15 mm, misturadores de vidro, caixa com luz indireta para leitura, soro controle positivo, soro controle negativo, cronômetro e caneta marcador permanente para numerar as amostras nas delimitações da placa de vidro.

As 50 amostras dos soros caninos e o antígeno foram equilibrados à temperatura de $22^{\circ}\text{C} + 4^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 30 minutos antes da execução do teste e homogeneizados antes de realizar a prova. Com as placas, misturadores e pipetas limpos para evitar contaminação, identificaram-se as divisões da placa de vidro aonde será depositado cada amostra de soro.

Com o auxílio do micropipetador foram depositados $30\ \mu\text{L}$ do soro sobre a placa de vidro, encostando-se a ela a ponta da pipeta em ângulo de 45° , após isso, foi adicionado o antígeno previamente homogeneizado ao lado do soro, mas sem ser misturado nele. Em seguida, utilizando o misturador de vidro, para misturar o antígeno e o soro, por meio de movimentos circulares de modo a obter um círculo de aproximadamente 2 cm em cada divisória da placa de vidro (figura 6).

Figura 6 – Placa de vidro quadriculada utilizada para a mistura de soro antígeno.



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

Na sequência, agitou-se cuidadosamente a placa de modo a obter movimentos rotatórios lentos e constantes, em uma frequência de aproximadamente 30 movimentos por minuto, com o objetivo de permitir que a mistura soro antígeno fluísse lentamente dentro de cada círculo formado. A placa foi agitada continuamente por quatro minutos, e logo em seguida, foi colocada sobre a caixa de leitura com luz indireta para análise dos resultados conforme a figura 8, as

aglutinações que ocorreram após quatro minutos foram desconsideradas. Quando ocorreu a formação dos grumos de aglutinação o resultado foi considerado positivo (figura 6), e na ausência dos mesmos, o resultado foi considerado negativo.

Figura 7 – Interpretação da prova de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), a presença dos grumos de aglutinação indica que o resultado é positivo (Amostra A). A ausência dos grumos de aglutinação indica o resultado como negativo (Amostra B).

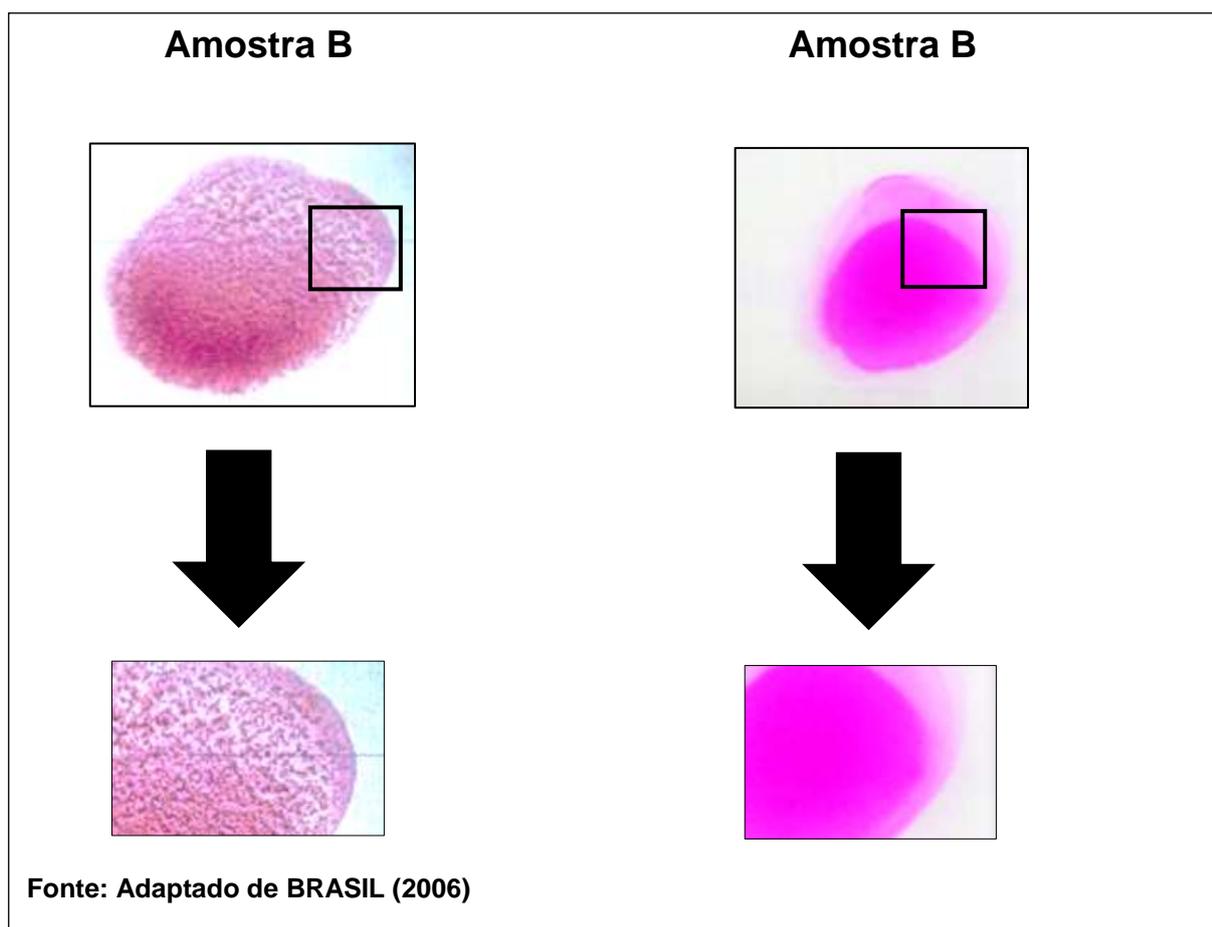
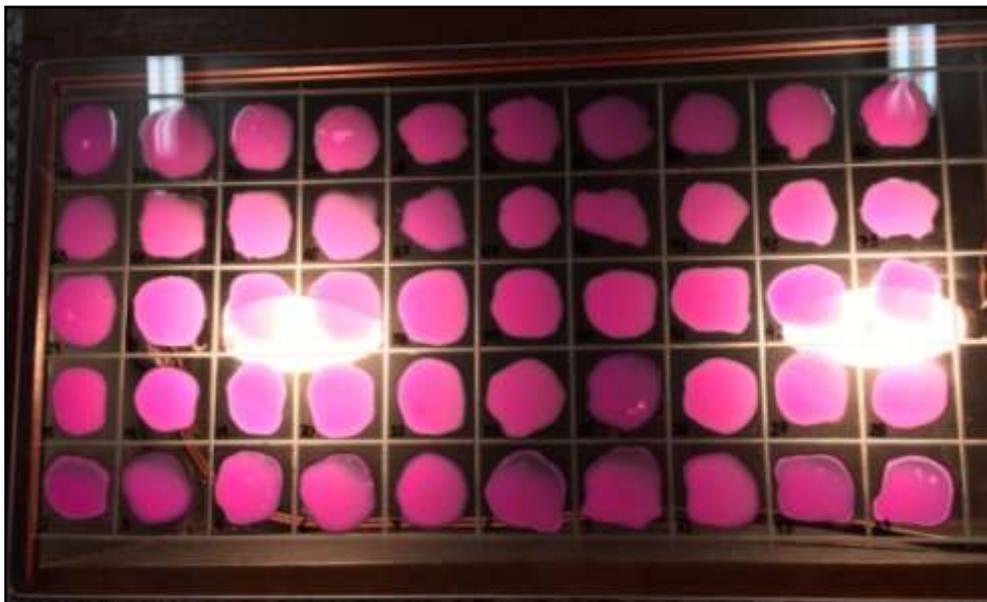


Figura 8 – Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), utilizado para diagnóstico da *B. abortus*.



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

Figura 9 – Caixa de leitura com luz indireta utilizada no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para o diagnóstico de *B. abortus*, não observa-se a formação de grumos na figura.



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

6 RESULTADOS

Ao analisar as amostras de soro canino por meio do teste imunocromatográfico, após o período recomendado de 20 minutos, foi observada somente a presença de uma linha-controla (letra C) na janela de resultado do teste, deste modo, as 50 amostras de soro canino testadas foram não reagentes.

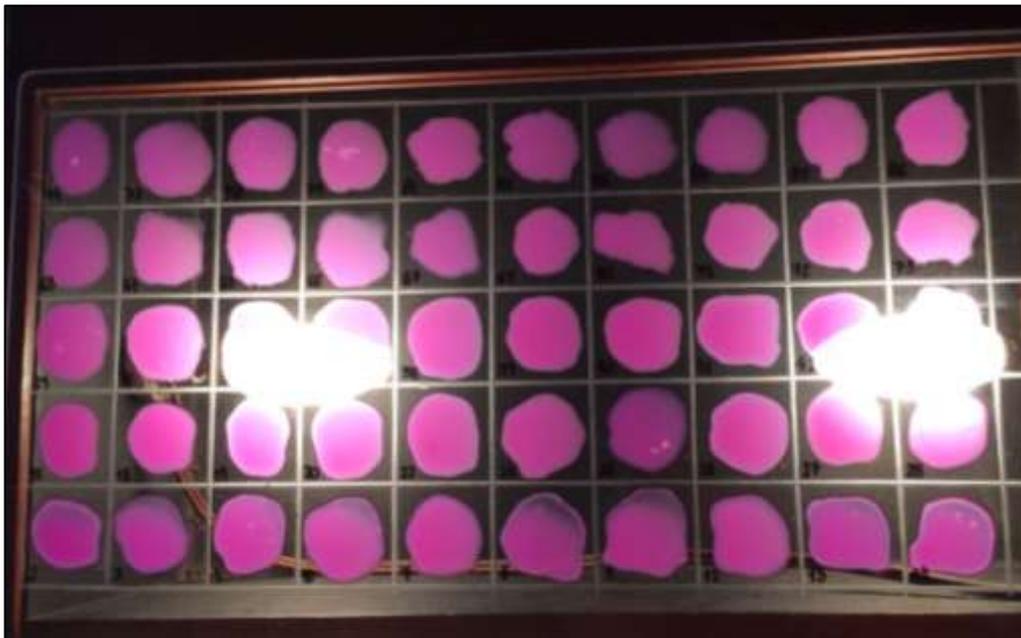
Figura 10 – Interpretação dos resultados do teste imunocromatográfico para *B. canis*, observa-se a formação de somente uma linha na janela de controle (letra C).



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

A prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi realizada para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus*, porém não foi observado à formação de aglutinação nas 50 amostras analisadas, indicando o diagnóstico para *B. abortus* negativo.

Figura 11 – Na caixa de leitura não foi observado à formação de aglutinação nas amostras da placa de vidro, sendo indicativo de resultado não reagente para *Brucella abortus*.



Fonte: Imagem de acervo pessoal (2018)

7 DISCUSSÃO

Conforme visto anteriormente, uma das metodologias empregadas no diagnóstico de rotina das *Brucellas* spp. são os métodos indiretos, por meio de testes sorológicos. Dois importantes critérios para a escolha de testes de diagnóstico são a sensibilidade e a especificidade³. Entretanto, alguns autores apontam que testes sorológicos disponíveis para diagnosticar brucelose canina carecem de sensibilidade diagnóstica^{37, 14, 12, 17}.

Em visto do exposto, KEID *et al.* (2015) ao comparar em seu estudo as técnicas de SAR, SAR-2ME, IDGA e ICT, o ICT demonstrou-se eficiente no comparativo de testes, ao apresentar alta sensibilidade de 90% e especificidade de 90,1 %. Sendo assim, baseado nos valores de alguns estudos onde o ICT obteve destaque como um método sorológico de diagnóstico atual, efetivo, rápido, sensível e específico em seus resultados, no presente trabalho optou-se por utilizar o teste imunocromatográfico^{12, 57}.

A escolha do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), adotado oficialmente pelo PNCEBT como um modelo de teste de triagem, se deu devido à presença da atividade de criação bovina na região do estudo o que possibilita o contato entre bovinos e caninos.

As características apresentadas na região sugerem a possibilidade de infecção por *B. canis* e *B. abortus*, uma vez que, a notável presença do aumento populacional e reprodutivo de cães desassistidos, bem como áreas de ocupações irregulares e deficientes de controles sanitários, somado ao contato de cães com bovinos, podem favorecer a disseminação desta doença, caso exista um indivíduo soropositivo.

O diagnóstico de brucelose canina tem sido realizado em diversas regiões do Brasil, por meio da detecção de anticorpos e de acordo com os dados obtidos a frequência da *B. canis* variou de 0,3% a 54,77%^{60, 61, 62}. No entanto, os soros submetidos ao teste imunocromatográfico para detecção de *B. canis* foram negativos. As diferenças observadas entre o resultado do presente estudo e dos demais supracitados podem ser justificadas pela metodologia conduzida pelos diferentes testes sorológicos utilizados, que variam em sensibilidade, especificidade e complexidade. Os testes sorológicos mais rotineiramente empregados nos estudos

de brucelose canina são o SAL, SAR, SAR-ME, IDGA e os Imunoensaios Imunoenzimáticos (ELISA) ¹³. Por outro lado, isso pode ser justificado pelo fato de que os cães podem não terem tido contato com a bactéria, portanto não foram infectados por *B. canis*. De outra forma, alguns autores apontam que a resposta sorológica à infecção por *Brucella* pode ser influenciada por diversos fatores, destacando o longo e variável período de incubação da doença, durante o qual a sorologia apresenta-se negativa, como também a variação individual da resposta imune do indivíduo ^{1, 3, 60, 57, 12, 13}. Embora, outra hipótese plausível no presente estudo se deu devido o uso de um determinado número de amostras aleatórias de cães pertencentes a diferentes tutores e a uma determinada região do município de São Paulo, que de certa forma não foram apresentados históricos de desordens reprodutivas que suscitasse a infecção por *B. canis*, e a grande maioria dos estudos sobre brucelose canina são conduzidos em animais de canis com problemas reprodutivos ou animais com histórico de problemas reprodutivos sugestivos de *B. canis*. Em canis, as taxas de infecção tendem a ser mais elevadas em virtude do ambiente propício para rápida difusão da infecção ^{13, 60, 61, 62}.

Todas as amostras submetidas ao Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) apresentaram-se negativas para *B. abortus*. Embora exista o possível contato de cães e bovinos na região, isso pode ser justificado pelo fato de que a infecção de *B. abortus* é esporádica em cães, pois esta espécie apresenta ter mais resistência à infecção por brucelas lisas, tornando as manifestações clínicas raras ⁶⁰.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que, nos animais as amostras de soro dos cães da Ilha do Bororé foram não reagentes para *B. canis* e *B. abortus*.

9 REFERÊNCIAS

1. Mélo SKM, Silva ERR, Hunk MM, Manso HE. Brucelose canina: Revisão de literatura. Ciênc. vet. tróp., v. 16, no 1/2/3, p.7-17. Recife-PE, 2013.
2. Lima JTR. Avaliação de marcadores sorológicos, microbiológicos e moleculares para diagnóstico da brucelose canina. [Tese de doutorado em ciências]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2017.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Programa Nacional De Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT]. Brasília, 2006.
4. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [HTTP://www.agricultura.gov.br/](http://www.agricultura.gov.br/). Acesso 6 de setembro de 2018.
5. Machado MA. Soler NB. Freitas JC. Porcentagem de cães soropositivos para *Brucella canis* apresentando problemas reprodutivos atendidos no hospital veterinário Estadual de Londrina. Ars Veterinária, v. 29 no 3, p 161-168. Londrina, 2013.
6. Milano HP. *Brucella canis*: Sua importância no Brasil. [Monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
7. Greene CE, Carmichael LE. Canine Brucellosis. Infectious diseases of dog and cat. Missouri: Saunders, 2012.
8. Carmichael LE, Kenney RM. Canine Abortion Caused by *Brucella canis*. Journal of American Veterinary Medical Association, v. 152, n. 6, p. 605-616, 1968.
9. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Rio de Janeiro, 2015.
10. Abinpet, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. [Dados do mercado em internet]. Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em 29 de agosto de 2018.

11. FCI. Fédération Cynologique Internationale. Disponível em: <http://www.fci.be/en/>. Acesso em 27 de setembro de 2018.
12. Keid LB, Chiebao DP, Batinga MCA, Faita T, Diniz JA, Oliveira TMF *et al.* *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. *Transboundary and Emerging Disease*, 2017.
13. Keid LB, Diniz JA, Oliveira TM, Ferreira HL, Soares RM. Evaluation of Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015.
14. Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Megid J, Salgado, VR *et al.* A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*, 2007.
15. Cortes VA, Oliveira MCG, Ito FH, Vasconcellos SA. 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. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*; São Paulo, 1988.
16. Megid J, Moraes CCG, Marcos J, Agottani JVB. Perfil sorológico, isolamento bacteriano e valores hematológicos e urinários em cães naturalmente infectados com *Brucella canis*. *Ciência Rural*, 2000.
17. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: Inra, 1976.
18. Paulin LM. Artigo de revisão: Brucelose. *Arquivo Instituto Biológico*. São Paulo, 2003.
19. Godoy AM, Peres JN, Barg L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*. Minas Gerais, 1977.
20. Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Development in Biological Standardization*, 1984.
21. Borie C, Cepada R, Villarroel M, De los reyes M. Descripción de características reproductivas em tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Archivos de Medicina Veterinária*, 2002.

22. Souza MG, Carareto R, Apparício MS. Brucelose canina – aspectos clínicos em um cão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2003.
23. Sherding RG, Bichard SJ. *Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, 1998.
24. Meyer KF, Shaw EB. Comparison of morphologic, cultural and biochemical characteristics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Journal of Infectious Diseases*, 1920.
25. Hughes ML. The natural history of certain fevers occurring in the Mediterranean. *Mediterranean Nature*, 1893.
26. Buddle MB. Studies on *Brucella ovis* n. sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *The Journal of Hygiene*, 1956.
27. Greene CE. Moléstias bacterianas. In Ettinger, SJ, Feldman EC. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4. Ed. São Paulo, Manole, 1995.
28. International Committee on Systematics of Prokaryotes: Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Pamplona, Spain 2006.
29. Huddleson IF. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. *Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin*, 1929.
30. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 1997.
31. Stoenner HG, Lackman DB. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *neotoma lepida* Thomas. *American Journal of Veterinary Research*, 1957.
32. Villalobos-Vindas JM, Amuy E, Barquero-Calvo E, Rojas N, Chacón-díaz C, Chaves-Olarte E, *et al.* Brucellosis caused by the Wood rat pathogen *Brucella neotomae*: two case reports. *Journal of Medical Case Report*, 2017.

33. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, *et al.* *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010.
34. Flores-Castro R, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *The Cornell Veterinarian*, 1976.
35. Scholz HC, Dahouk AL, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Hofer E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016.
36. Hollett R B, Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, 2006.
37. Wanke, M. M. Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science*, 2004.
38. Spink WW. Comments on canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1970.
39. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC, *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*. London, 2006.
40. Ying W, Nguywn MQ, Jahre JA, *Brucella canis* endocarditis: case report. *Clinical Infectious Diseases*, 1999.
41. OIE (World Organisation for Animal Health). Disponível em: <http://www.oie.int/>. Acesso em 11 de outubro de 2018.
42. Figueira T, Mandelbaum MA, Marques APL, Torres HM, Figueiredo MJ, Serra CMB, Aquino MHC. Inquérito sorológico da brucelose canina através da utilização de antígenos externo e interno de *Brucella canis* e *Brucella ovis*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2007.
43. Miranda, K. L.; Cottorello, A. C. P.; Poester, F. P.; Lage, A. P. Brucelose canina. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, 2005.

44. Carmichael, L. E. Abortion in 200 beagles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1966.
45. Jones LM, Zanardi M, Leong D, Wilson JB. Taxonomic position in the genus *Brucella* of the causative agent of canine abortion. *Journal of Bacteriology*, 1968.
46. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, 2005.
47. Larsson MHMA, Costa EO. Isolation of *Brucella canis*. *International Journal of Zoonosis*.
48. Nelson, R. W, Couto, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Ed. 2. Guanabara: Koogan. São Paulo, 2001.
49. Nielsen, K. *Diagnosis of Brucellosis by serology*. *Veterinary Microbiology*, 2002.
50. Chacón-Díaz C, Altamiro-Silva P, González-Espinoza G, Medina MC, Bouza-Mora L, Wong M *et al*. *Brucella canis* is an intracellular pathogen inducing a lower proinflammatory response than smooth counterparts. *Infection and Immunity*, 2015.
51. Sandoval L A, Ribeiro LOC, Amaral LBS, Feitosa MH, Bazan JM. Incidência da brucelose canina na Cidade de São Paulo. *O biológico*, 1976.
52. Alere SA. Alere Brucelose Ac Test Kit. Ficha técnica. São Paulo, 2017.
53. Keid LB, Soares RM, Morais ZM, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. *Brucella* spp. Isolation from dogs from commercial breeding kennels in Sao Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*, 2004a.
54. Johnson CA, Walker RD. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary*, 1992.

55. OMS (8° Informe Técnico da OMS, 1992). Disponível em: www.who.int/eportuguese/publications/pt/. Acesso em 14 de outubro de 2018.
56. Keid LB, Soares RM, Chiebao DP, Vasconcellos SA, Richtzenhain L J. Brucelose em canis comerciais do Município de São Paulo. Arquivos Instituto Biológico de São Paulo, 2004b.
57. Kim JW, Lee YJ, Han MY, Bae DH, Jung SC, Cho BK *et al.* Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. The Journal of Veterinary Medical Science, 2007.
58. Inquérito de Saúde (ISA-Capital 2015). Secretaria Municipal da Saúde Coordenação de Epidemiologia e Informação. Disponível em: secretarias/upload/saude/arquivos/publicacoes/isa_2015_cg.pdf Acesso em 28 de outubro de 2018.
59. FCI. Fédération Cynologique Internationale. Disponível em: <http://www.fci.br/en/>. Acesso em 25 de outubro de 2018.
60. Azevedo SS, Vasconcellos AS, Alves CJ, Keid LB, Grasso LMP, Mascoll R *et al.* Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2003.
61. Aguiar DM. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro. Ciência Rural, 2005.
62. Santana JA, Dorneles EMS, Jayme VS, Galvão SR, Minharro S, Santos H *et al.* Risk factors and presence of antibodies to *Brucella canis* and smooth *Brucella* in dogs from the municipality of Araguaína, Tocantins, Brazil. Ciências Agrárias (Online), 2013.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: Amane Gonçalves; Rafael Agopian.

Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

- A pesquisa analisa a ocorrência de doenças infecciosas em cães em campanhas de controle populacional animal na Zona Sul do município de São Paulo e será realizada através da coleta de sangue e urina do animal;
- Você poderá solicitar informações ou esclarecimentos sobre o andamento da pesquisa em qualquer momento com o pesquisador responsável, sendo o resultado do exame informado por e-mail ou telefone;
- Sendo um participante voluntário, você não terá nenhum pagamento e/ou despesa referente à sua participação no estudo;

Eu, _____ como voluntária da pesquisa, afirmo que fui devidamente informada respeito dos procedimentos a serem realizados para colheita de material biológico (sangue e urina) com o animal acima identificado, o qual sou responsável e proprietário de seu domicílio, e reconheço ainda a importância deste trabalho para o controle das doenças transmissíveis desta região, bem como para a saúde do animal sob meus cuidados. Meu nome não será divulgado de forma nenhuma e terei a opção de retirar meu consentimento a qualquer momento.

São Paulo, ____ de _____ de 201__

(Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa)

Assinatura do pesquisador