

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM
HUMANOS E CÃES DE ILHAS OCEÂNICAS E LITORAL CONTINENTAL

NOELIA LAYSLLA COSTA BARROS

BOTUCATU -SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM
HUMANOS E CÃES DE ILHAS OCEÂNICAS E LITORAL CONTINENTAL

NOELIA LAYSLLA COSTA BARROS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Camila M.
Appolinário

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barros, Noelia Layslla Costa.

Investigação sorológica e molecular de *Brucella* spp. em humanos e cães de ilhas oceânicas e litoral continental / Noelia Layslla Costa Barros. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Camila Michele Appolinário

Capes: 50502000

1. *Brucella abortus*. 2. *Brucella suis*. 3. Brucelose.
4. Saúde pública.

Palavras-chave: *Brucella abortus*; *Brucella canis*; *Brucella suis*; Brucelose; Saúde pública.

Nome da Autora: Noelia Layslla Costa Barros

Título: INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM HUMANOS E CÃES DE ILHAS OCEÂNICAS E LITORAL CONTINENTAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Assistente Dra. Camila M. Appolinário

Orientadora

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ/UNESP – Botucatu - SP

Profa. Adjunta Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva

Departamento de Medicina Veterinária

CECA/UFAL – Rio Largo - AL

Prof. Titular Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ/UNESP – Botucatu - SP

Data da defesa: 26 de abril de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos do reino animal.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão e apoio emocional nos momentos mais difíceis.

Às minhas orientadoras, Jane Megid e Camila Michele Appolinário, pela confiança, direcionamentos e oportunidade de participar deste estudo.

Ao professor Alexander Welker Biondo e a sua equipe, pelas amostras cedidas e pela disponibilidade em ajudar.

Ao ANSES, laboratório francês de referência para o diagnóstico da brucelose, que apoiou este trabalho.

À professora Karla Patrícia Chaves da Silva que fez a ponte entre mim e a Professora Jane Megid, sendo essencial para a minha formação.

Ao professor Mateus de Souza Ribeiro Mioni, pela disponibilidade e apoio emocional.

Ao pessoal do laboratório, Wanderson, Matheus e Bruna, pelo suporte durante toda a execução deste trabalho.

Aos meus professores e mestres, pelos ensinamentos que se somaram para formar uma nova mestra.

Aos amigos que se foram e aos que ficaram, sou grata por todos os momentos compartilhados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a minha a minha formação.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. Coordinates, total of human population and number of samples of dogs and humans, collected in each locality.	32
TABLE 2: Characteristics of the human sampling population.	33
TABLE 3: Characteristics of seropositive dogs.....	34
TABLE 4: Characteristics of the dog sampling population.	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1. The study area location. The maps were created with mapchart.net and google.com.br/maps and adapted by the authors.	31
---	----

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Brucelose canina.....	3
2.2 Aspectos de saúde pública	12
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.1 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO	19
CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
1. Discussão geral.....	36
2. Limitações do estudo	40
3. Conclusões gerais.....	41
5. Referências bibliográficas.....	42

BARROS, N. L. C. **INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Brucella* spp. EM HUMANOS E CÃES DE ILHAS OCEÂNICAS E LITORAL CONTINENTAL.** Botucatu, 2023. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Embora *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis* possam infectar humanos e cães, até o momento, nenhum estudo avaliou a circulação dessas espécies em humanos e seus cães, em ilhas e litoral continental. Para atingir este objetivo, este estudo utilizou testes sorológicos (teste de aglutinação em microplacas com 2-mercaptoetanol, ensaio imunocromatográfico e antígeno acidificado tamponado) e um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) gênero-específico para a detecção do DNA bacteriano. Nenhuma soropositividade para *B. abortus* e *B. suis* foi detectada em soros humanos ou caninos. A soropositividade para *B. canis* foi observada em 3/148 (2,0%) dos cães avaliados, mas nenhuma das amostras humanas foi positiva para *B. canis*. Além disso, todas as amostras, de ambas as espécies, foram negativas no ensaio de PCR gênero-específico para *Brucella*. Os cães soropositivos residiam no litoral continental (município de Guaraqueçaba-PR), porém não eram relacionados. A ausência de soropositividade nas ilhas e a baixa soropositividade no litoral continental pode ser reflexo do isolamento geográfico e sugere o baixo impacto da doença na região. Apesar da ausência de tutores sororreagentes, a presença de cães soropositivos indica a necessidade de medidas preventivas para evitar a transmissão antropozoonótica do patógeno.

Palavras-chave: Brucelose, *Brucella canis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, Saúde Pública

BARROS, N. L. C. **SEROLOGICAL AND MOLECULAR INVESTIGATION OF *Brucella* spp. IN HUMANS AND DOGS LIVING ON ISLAND AND MAINLAND SEASHORE AREAS.** Botucatu, 2023. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Although *Brucella abortus*, *Brucella suis* and *Brucella canis* may infect humans and dogs, no study up to date has assessed humans and their dogs from island and mainland seashore areas. To achieve this objective, this study used serological tests (microplate agglutination test with 2-mercaptoethanol, immunochromatographic assay, and rose bengal test) and a *Brucella* genus-specific PCR assay. No seropositivity to *B. abortus* and *B. suis* was detected in human or dog sera. Anti-*B. canis* seropositivity was observed in 3/148 (2.0%) of dogs, but none of the human samples were positive to *B. canis*. In addition, all of samples, from both species, were negative on *Brucella* genus-specific PCR assay. The seropositive dogs lived on the seashore mainland area (Guaraqueçaba city- PR), though they were not related. The absence of seropositivity on the islands and the low seropositivity on the seashore mainland may reflect the geographic isolation and suggests the low impact of the disease in the region. Despite the absence of seropositive owners, the presence of seropositive dogs indicates the need for preventive measures to avoid anthrozoonotic transmission of the pathogen.

Keywords: Brucellosis, *Brucella canis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, public health.

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A relação entre humanos e animais sofreu várias transformações desde o processo de domesticação até os dias atuais. Os cães foram, provavelmente, a primeira espécie animal a ser domesticada, ao se aproximarem dos humanos em busca de alimento e, nos primórdios dessa relação, exerciam apenas funções instrumentais, como auxiliar na caça ou realizar a guarda do território ocupado. Milhares de anos depois, outras espécies também foram domesticadas com o objetivo de servirem de alimento, vestuário e força de tração (DE SOUZA CABRAL & SAVALLI, 2020; WALLACH, 2022).

Atualmente, muitas dessas relações foram mantidas com as mesmas finalidades da época pré-histórica, porém, algumas foram ressignificadas conforme as necessidades do homem contemporâneo. Os animais de fazenda passaram a ser manejados para atingir melhores índices zootécnicos, enquanto os cães adentraram os lares e hoje fazem parte da família. Esse estreitamento da relação humano-animal, trouxe benefícios mútuos no decorrer da história. Contudo, também trouxe riscos à saúde, uma vez que a proximidade com os animais aumentou o risco de transmissão de agentes zoonóticos (LIMA *et al.*, 2022).

A brucelose é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Brucella* que afeta humanos e animais, sendo, portanto, considerada uma zoonose (HULL & SCHUMAKER, 2018). O gênero é composto por várias espécies, algumas bastante conhecidas por causar febre ondulante em humanos e distúrbios reprodutivos em animais, enquanto outras têm sua importância na saúde humana e animal pouco esclarecida (EL-SAYED & AWAD, 2018; HÖRDT *et al.*, 2020). Embora *Brucella* spp. estejam associadas a um hospedeiro preferencial, não costumam ser espécie-específicas, podendo afetar outras espécies pelo contato direto ou indireto com animais infectados (HULL & SCHUMAKER, 2018).

Os bovinos e os búfalos são os hospedeiros preferenciais de *Brucella abortus*, enquanto os suínos são os hospedeiros preferenciais de *Brucella suis* (biovars 1 e 3) (EL-SAYED; AWAD, 2018; HULL; SCHUMAKER, 2018). No entanto, essas espécies também podem infectar humanos e cães (SOUSA *et al.*,

2017). Em humanos é considerada principalmente uma doença ocupacional, acometendo trabalhadores relacionados à cadeia produtiva da carne, leite e derivados, bem como profissionais da saúde animal, como veterinários, seus auxiliares e tratadores de animais (LYTRAS; DANIS; DOUNIAS, 2016). Para as pessoas sem o risco ocupacional da enfermidade, a infecção de origem alimentar é mais importante (LYTRAS; DANIS; DOUNIAS, 2016). Apesar disso, a enfermidade é considerada subdiagnosticada, subnotificada ou negligenciada pelos órgãos de saúde (CORBEL *et al.*, 2006; LAWINSKY *et al.*, 2010). Os cães com acesso a animais selvagens ou de produção infectados, ou que consomem alimentos contaminados, incluindo os humanos, também podem se infectar (XAVIER *et al.*, 2009; MOR *et al.*, 2016;).

Brucella canis tem por hospedeiro preferencial o cão, causando a brucelose canina, podendo também infectar humanos durante a interação homem-animal. A transmissão da doença entre cães, geralmente, está associada à reprodução e ao contato com secreções reprodutivas de animais infectados. Porém, outros fluidos corporais e secreções biológicas podem conter a bactéria e representar fontes de contágio (SANTOS *et al.*, 2021). Os humanos se infectam por meio do contato direto ou indireto com cães infectados e com suas secreções contaminadas, embora, muitas vezes, esse potencial zoonótico seja negligenciado e pouco reconhecido (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; SANTOS *et al.*, 2021). A infecção nos humanos costuma ter sintomatologia inespecífica, podendo a doença cursar de modo brando ou até mesmo assintomático, o que dificulta o diagnóstico. Além disso, os testes sorológicos convencionais para o diagnóstico da brucelose humana costumam ser específicos para a detecção de amostras lisas (ex.: *B. abortus*), sendo incapazes de detectar amostras rugosas (ex.: *B. canis*), o que contribui para o subdiagnóstico da doença (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; HULL & SCHUMAKER, 2018).

Desse modo, devido à importância da brucelose humana e animal, e à ausência de estudos nas regiões das ilhas oceânicas e do litoral continental do estado do Paraná, sul do Brasil, o presente estudo objetivou investigar a ocorrência de *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* nas populações humana e canina destas regiões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Brucelose canina

A brucelose canina é uma enfermidade infectocontagiosa crônica causada, principalmente, por *Brucella canis*, embora os cães também sejam suscetíveis à infecção por *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, quando em contato com animais de produção infectados ou produtos de origem animal contaminados (GREENE & CARMICHAEL, 2015; QUINN et al., 2007). De maneira geral, causa desordens reprodutivas em animais sexualmente maduros, incluindo abortamentos, mortalidade neonatal, orquite, epididimite e esterilidade nos machos (QUINN et al., 2007). Os cães e canídeos silvestres são considerados hospedeiros preferenciais de *B. canis*, servindo como reservatórios do agente e fontes de infecção para outras espécies de suscetíveis (SANTOS et al., 2021). A doença é considerada zoonose, pois os humanos podem se infectar durante o contato com cães infectados ou suas secreções contaminadas (GREENE & CARMICHAEL, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016).

Etiologia

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são cocobacilos gram-negativos, que medem entre 0,6 – 1,5µm de comprimento por 0,5 – 0,7µm de largura. Geralmente são encontradas de forma isolada ou, com menor frequência, em pares ou em pequenos grupos. São imóveis, aeróbias e capnofílicas, não formam esporos, e não possuem *pili* ou cápsulas (QUINN et al., 2007; MEGID & MATHIAS, 2016; DE MASSIS et al., 2022). Anteriormente, eram consideradas aflageladas, porém, estudos mostraram que algumas espécies possuem flagelo, ou, ao menos, apresentam o gene codificador de flagelo, cuja função está relacionada a mecanismos de virulência, como infectividade, crescimento celular e formação de biofilmes (COLOMA-RIVERO et al., 2021).

De acordo com a estrutura da parede celular e a morfologia da colônia, podem ser classificadas como lisas ou rugosas. As lisas possuem o lipopolissacarídeo (LPS) completo, contendo o lipídio A (região hidrofóbica e endotoxina), o núcleo (composto por oligossacarídeos) e a cadeia O (região hidrofílica). A cadeia O determina a conformação de três epítopos: C, M e A. O

epítopo C está presente em todas as espécies lisas, o epítopo M em *B. melitensis* e o A em *B. abortus*. As rugosas possuem o LPS incompleto, com o antígeno O ausente ou vestigial (LIU, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016).

B. canis não possui biovares, é isolada na presença de tionina, mas não na presença de fucsina básica e não requer dióxidos de carbono para o seu primeiro isolamento. Suas colônias são rugosas ou mucoides, sendo a forma lisa nunca reportada. São positivas na técnica de aglutinação com soro monoespecífico R e negativas frente aos soros A e M. Não produzem sulfeto de hidrogênio nem reduzem nitratos a nitritos (DE MASSIS *et al.*, 2022).

Epidemiologia

O primeiro isolamento e caracterização da *B. canis* ocorreu em 1966 durante um surto de abortos e infertilidade em cães, nos Estados Unidos da América (CARMICHAEL & BRUNER, 1968). Desde então, a enfermidade vem sendo reportada em diferentes países. A frequência de cães infectados por *B. canis* no mundo variou de zero a 48,7%, tendo o Brasil estimativa de 10,5%. Essa ampla variação na frequência pode estar relacionada a vários fatores, como o delineamento amostral empregado, o exame diagnóstico utilizado e seu algorítmico de interpretação. Porém, a doença possui distribuição mundial, ressaltando sua importância na saúde pública (SANTOS *et al.*, 2021).

Os cães e canídeos silvestres são as principais espécies acometidas por *B. canis*, embora a infecção possa ocorrer, ocasionalmente, em humanos (HULL & SCHUMAKER, 2018; DE MASSIS *et al.*, 2022). Outros animais como felinos, bovinos, ovinos e suínos, aparentam ser resistentes à infecção por *B. canis* (GREENE & CARMICHAEL, 2015; DE MASSIS *et al.*, 2022). A transmissão da brucelose canina ocorre, predominantemente, pela via oral, nasal, conjuntival ou sexual (SANTOS *et al.*, 2021). Os cães se infectam, principalmente, durante o acasalamento ou por via oronasal, pelo contato com as secreções reprodutivas de um animal infectado. As secreções vaginais, o conteúdo abortado, o sêmen e a urina (dos machos) possuem grande quantidade de bactérias, favorecendo a disseminação da doença (GREENE & CARMICHAEL, 2015). A *B. canis* também pode ser isolada do sangue, leite, saliva, fezes e secreção nasal de cães infectados, porém, a infecção por contato com esses materiais é bastante

incomum (GREENE & CARMICHAEL, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016; COSFORD, 2018; HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). A transmissão transplacentária é mais importante do que a transmamária para os filhotes de gestações levadas à termo, uma vez que o leite possui baixas concentrações de bactérias e é mais provável que o filhote seja infectado ainda na vida intrauterina (GREENE & CARMICHAEL, 2015). Além disso, outra forma de transmissão inclui fômites, como vaginoscópios, seringas contaminadas, equipamentos de inseminação artificial e transfusão sanguínea (SUZUKI *et al.*, 2008).

Patogenia e sinais clínicos

Logo após a infecção, as bactérias do gênero *Brucella* desencadeiam uma reação inflamatória local, que não é capaz de eliminar o agente. No entanto, os macrófagos e outras células fagocitárias carregam a bactéria em seu interior até os linfonodos regionais. A partir disso, transitam dentro de macrófagos e neutrófilos pelas vias linfáticas e sanguíneas se disseminando pelos diferentes órgãos (LIU, 2015; HULL & SCHUMAKER, 2018). Na infecção por *B. canis*, a bacteremia tem caráter intermitente e se inicia dentro de 1 a 4 semanas após a infecção, podendo persistir de 6 a 64 meses. Durante esse período, a bactéria pode ser encontrada no sistema reprodutivo de machos e fêmeas, discos intervertebrais, olhos, rins e meninges (SUZUKI *et al.*, 2008; GREENE & CARMICHAEL, 2015). Os anticorpos produzidos não conferem proteção eficaz, por isso, a imunidade celular é, provavelmente, o principal mecanismo de defesa contra o agente (GREENE & CARMICHAEL, 2015).

A maioria das infecções por *B. canis* em cães cursam de modo assintomático, exceto pela linfadenomegalia. A febre é incomum, sendo os sinais clínicos geralmente relacionados ao sistema reprodutivo. Comumente, as fêmeas aparentemente saudáveis abortam com 45 a 55 dias de gestação e liberam descarga vaginal serosanguinolenta no pós-parto; quando a gestação é levada à termo, a ninhada é fraca e a morte neonatal é elevada. Na mesma ninhada podem existir filhotes visivelmente doentes ou aparentemente saudáveis. Além disso, na infecção congênita, os cães podem apresentar sinais da enfermidade no decorrer da vida. Falhas na concepção podem ocorrer, além

de morte embrionária e consequente absorção fetal. No entanto, é mais comum que os abortamentos sejam confundidos com falhas na concepção, especialmente quando ocorre entre 10 e 35 dias de gestação, pois as fêmeas tendem a ingerir o conteúdo abortado. As gestações seguintes ao primeiro abortamento podem apresentar ninhadas normais ou podem ser intercaladas com falhas reprodutivas, como novos episódios de abortamento (HULL; SCHUMAKER, 2018). Os machos podem apresentar aumento do volume escrotal, dermatite escrotal por lambedura, atrofia testicular, abscessos testiculares, hiperplasia prostática, perda da libido, oligospermia ou azoospermia (QUINN et al., 2007; GREENE & CARMICHAEL, 2015). Cães castrados ou que não possuem vida reprodutiva ativa são difíceis de diagnosticar, pois as principais manifestações clínicas estão relacionadas à reprodução (SANTOS et al., 2021). Outros sinais não relacionados a vida reprodutiva, como esplenomegalia, linfadenomegalia, discoespondilite, paresia, ataxia, osteomielite, poliartrite, uveíte, claudicação e meningoencefalite, também podem ocorrer (GREENE & CARMICHAEL, 2015; SANTOS et al., 2021).

Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose canina depende da sintomatologia clínica, epidemiologia e diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial pode ser direto, quando é demonstrada a presença do agente etiológico, ou indireto, quando baseado em mecanismos imunológicos que indicam vestígios da presença do agente. O diagnóstico direto pode ser realizado pelo isolamento e identificação da bactéria ou pesquisa de seu material genético. O diagnóstico indireto é realizado com base em testes sorológicos, que são amplamente utilizados por serem rápidos, simples e de baixo custo (quando comparados aos testes de diagnóstico direto) (QUINN et al., 2007; MEGID & MATHIAS, 2016).

O isolamento e identificação é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da doença, contudo, nem sempre é viável pela demora, exigências de cultivo e infectividade do agente, que pode levar a acidentes laboratoriais. Como o agente é altamente infeccioso (patógeno de classe III), vários cuidados devem ser tomados, como uso adequado dos equipamentos de proteção individual e manipulação da cultura em cabine de segurança microbiológica (LIU,

2015; MEGID & MATHIAS, 2016). As amostras recomendadas para cultivo são fetos abortados, secreção vaginal, sangue, sêmen e urina (DE MASSIS *et al.*, 2022). Nos casos de uveíte, pode-se utilizar o humor aquoso e, nos casos de discoespondilite ou osteomielite, pode-se utilizar a medula óssea (SANTOS *et al.*, 2021). A semeadura das bactérias pode ser realizada em meios comuns (ágar columbia, ágar sangue, ágar chocolate, ágar triptona de soja) ou meios seletivos (ágar *Brucella*, ágar triptose, meio Farrel e meio do Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria). É recomendada a suplementação dos meios com soro bovino ou equino de 2 a 5% e antimicrobianos, geralmente bacitracina, polimixina e cicloeximida, para favorecer o isolamento. A incubação deve ocorrer em aerobiose, entre 35-37°C por até 5 dias. Algumas espécies requerem adição de CO₂ (5-10%) para o seu isolamento, mas esse não é o caso da *B. canis*. As colônias suspeitas podem ser confirmadas por testes bioquímicos, pela suscetibilidade a bacteriófagos, pela necessidade de CO₂, pela inibição do isolamento na presença de corantes (tionina e fucsina básica) e pela aglutinação em soro monoespecífico (A, M e R) (QUINN *et al.*, 2007; GREENE; CARMICHAEL, 2015; LIU, 2015; MEGID; MATHIAS, 2016). A cultura negativa não elimina a possibilidade de infecção, já que a baixa sensibilidade do teste conduz a resultados falso-negativos. Porém, a cultura positiva é considerada prova definitiva da infecção (COSFORD, 2018; DE MASSIS *et al.*, 2022).

A pesquisa do material genético (DNA bacteriano) utiliza a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que é considerada uma técnica mais sensível do que o isolamento bacteriano e mais específica do que os testes sorológicos. Podem ser utilizadas tanto amostras de isolados bacterianos quanto amostras de sangue e tecidos biológicos, incluindo baço, fígado, linfonodos, placenta e conteúdo de abortamento (LIU, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016). As amostras de sangue total são preferíveis em relação ao soro, pois possui menor sensibilidade (KEID *et al.*, 2010). A maioria dos ensaios de PCR são gênero-específicos, tendo como principais alvos o gene BCSP31 e a sequência intergênica 16S e 23S do rRNA do agente (KEID *et al.*, 2007; MEGID & MATHIAS, 2016). Alguns PCRs multiplex foram empregados na diferenciação de certas espécies de *Brucella*, porém, apenas recentemente PCRs espécie-

específicos vem sendo desenvolvidos. Esses ensaios carecem de estudos sobre sensibilidade e especificidade, e, até que essas informações sejam disponibilizadas, devem ser utilizados em conjunto com os testes sorológicos (COSFORD, 2018).

Os testes sorológicos mais comumente empregados no diagnóstico da brucelose canina, utilizam antígeno de parede celular obtidos a partir de *B. canis* ou *B. ovis* (DE MASSIS *et al.*, 2022). Esses testes estão sujeitos a erros de interpretação, visto que apresentam reação cruzada com antígenos presentes em outros patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus equuli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*) (COSFORD, 2018; KAUFFMAN & PETERSEN, 2019; MOL *et al.*, 2020; DE MASSIS *et al.*, 2022). Reações inespecíficas também podem ocorrer em amostras de soro hemolisadas ou com elevado conteúdo lipídico (MOL *et al.*, 2020). Os testes que utilizam antígenos de proteínas plasmáticas são mais específicos, assim reações cruzadas ocorrem apenas para espécies do gênero *Brucella*. Contudo, a detecção de anticorpos ocorre mais tardiamente (8-12 semanas pós infecção), quando comparada com os que utilizam antígenos de parede celular (3-6 semanas pós infecção) (GREENE & CARMICHAEL, 2015). Na tentativa de aumentar a especificidade dos testes, os soros podem receber tratamento com 2-mercaptoetanol ou rivanol, para diminuir as reações inespecíficas com IgM, uma vez que IgG é a imunoglobulina mais específica no diagnóstico da brucelose (MINHARRO *et al.*, 2005; MEGID & MATHIAS, 2016). A utilização de *B. canis* não-mucóide (M-) na preparação de antígenos, também contribui para o aumento da especificidade dos testes sorológicos, pois reduz a ocorrência de aglutinações inespecíficas (KAUFFMAN & PETERSEN, 2019). Resultados falso-negativos podem ocorrer quando o teste preceder a soroconversão, ou na infecção crônica, quando os títulos estiverem abaixo de níveis detectáveis (DE MASSIS *et al.*, 2022).

Os principais testes utilizados são: SAR – soroaglutinação rápida em lâminas, SAR-2ME - soroaglutinação rápida em lâminas com 2-mercaptoetanol, TAT – teste de aglutinação em tubos, TAT-2ME - teste de aglutinação em tubos com 2-mercaptoetanol, IDGA – imunodifusão em gel de ágar, ensaio imunocromatográfico, e ELISA - *enzyme linked immuno sorbent assay* (GREENE

& CARMICHAEL, 2015; KEID et al., 2015). Outro teste pouco utilizado na literatura, porém aplicado em laboratórios de referência no diagnóstico da brucelose canina, na Europa, é a MAT-2ME - microaglutinação em placas com 2-mercaptoetanol (DE MASSIS et al., 2021).

O TAT é um teste semiquantitativo que reage tanto com IgM quanto com IgG, o que diminui a especificidade do teste e resulta em resultados falso-positivos. O uso de antígenos preparados com *B. canis* (M-) e a adição de 2-ME, que elimina as pontes dissulfídicas do IgM, contribuem com o aumento da especificidade do teste. Atualmente, falta padronização da interpretação da TAT-2ME, entretanto, recomenda-se considerar títulos até 50 como negativos, entre 50 e 100 suspeitos e maiores ou iguais a 200 positivos, pois, este último geralmente é associado a hemoculturas positivas (MINHARRO et al., 2005; GREENE & CARMICHAEL, 2015). A TAT foi adaptada para um sistema em placas de microtitulação (MAT), que tem por vantagens a redução da quantidade de antígeno e o aumento do número de testes realizados num mesmo intervalo de tempo (GREENE & CARMICHAEL, 2015; KAUFFMAN & PETERSEN, 2019). O ponto de corte do teste diverge conforme diferentes autores, ressaltando a importância da padronização do teste (KIMURA et al., 2008; CASTILLO et al., 2014; DE MASSIS et al., 2021).

O ensaio imunocromatográfico é um teste qualitativo usado para detectar anticorpos contra *B. canis*. Antígenos de *B. canis* altamente seletivos são usados como captura e detector no ensaio. Esses antígenos possibilitam a detecção direta e altamente precisa de anticorpos anti-*B. canis*. A sensibilidade e a especificidade são de 90% e 90,1%, respectivamente (BIONOTE, 2023). Por estar disponível comercialmente em versões para uso na clínica, muitas vezes é utilizado como teste de triagem ou em conjunto com outros testes mais específicos, com resultado mais confiável (DE MASSIS et al., 2021).

É importante considerar que os testes sorológicos que utilizam antígeno de parede celular, são específicos para identificação de isolados rugosos, não sendo capazes de diagnosticar isolados lisos (MEGID & MATHIAS, 2016). Desse modo, em casos de suspeita da brucelose canina por *B. abortus*, *B. suis* ou *B. melitensis* (esta última ainda não isolada no Brasil), são recomendados testes

sorológicos específicos para o S-LPS. Seguindo as recomendações do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), como teste de triagem, e os testes de soroaglutinação lenta em paralelo ao teste 2-mercaptoetanol (SAL-2ME), como testes confirmatórios, podem ser usados para a detecção de anticorpos anti- isolados lisos (BRASIL, 2006).

O AAT é considerado teste qualitativo, rápido, de baixo custo e boa sensibilidade e, por isso, é amplamente utilizado como teste de triagem. Utiliza antígeno com células inteiras de *B. abortus* (amostra 1119-3) em concentração de 8%, em pH de 3,65, corado com rosa bengala. O pH ácido reduz a aglutinação por IgM e aumenta a por isótopos de IgG1, reduzindo as reações falso-negativas (BRASIL, 2006; MEGID & MATHIAS, 2016). A SAL-2ME é utilizada como teste confirmatório dos soros positivos no AAT, pois tem maior especificidade e mantém boa sensibilidade. Utiliza antígeno preparado com *B. abortus* 1119-3, diluído a 4,5% em suspensão salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Detecta, principalmente, IgG pois o 2ME degrada as subunidades do IgM que perdem a capacidade aglutinante. A interpretação é realizada comparando-se os títulos de soros sem tratamento (SAL) com os que foram tratados (2ME), sendo esperado título maior ou igual na SAL em relação ao 2ME pela aglutinação de IgM e IgG (BRASIL, 2006).

Tratamento

O tratamento da brucelose canina não é recomendado pela dificuldade na eliminação do agente nos animais infectados. Os antimicrobianos nem sempre conseguem atingir as bactérias protegidas no meio intracelular, mantendo o cão portador e fonte de infecção para humanos e outros animais suscetíveis. Apesar disso, em alguns casos excepcionais, é admitido o tratamento de cães de estimação que não tenham finalidade reprodutiva (GREENE & CARMICHAEL, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016).

Estudos indicam a sensibilidade *in vitro* do agente a tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicosídeos, espectinomicina, rifampicina, cefalosporinas de terceira geração, ampicilina, sulfonamidas potencializadas e quinolonas (GREENE & CARMICHAEL, 2015; SANTOS et al., 2021). Porém, nem sempre

há correspondência com a sensibilidade *in vivo*, pelo caráter intracelular facultativo da bactéria (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). A associação de antimicrobianos é recomendada pois é considerada mais efetiva, quando comparada a monoterapia, e resulta em menos casos de recidiva (SANTOS *et al.*, 2021).

Em cães de estimação, a terapia com doxicilina ou minociclina associada à estreptomicina costuma ser eficaz. Acredita-se que a doxiciclina e a minociclina consigam penetrar nos tecidos e atingir melhores concentrações no meio intracelular por serem mais lipossolúveis. Além do tratamento com antimicrobianos, os cães também devem ser castrados para reduzir ainda mais as chances de transmissão aos contactantes. O veterinário nunca deve pressupor cura bacteriológica, pois casos de recidiva podem ocorrer dentro de semanas ou até meses após o término da antibioticoterapia. No entanto, em cães castrados, mesmo na condição de portadores, a eliminação do agente é menos provável. Ademais, os animais devem ser acompanhados por exames sorológicos e de hemocultura repetidos por pelo menos seis meses após o tratamento, a fim de avaliar a eficácia (GREENE & CARMICHAEL, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016; SANTOS *et al.*, 2021).

Cães não tratados podem apresentar cura espontânea dentro de 1 a 5 anos após a infecção, porém, isso não ocorre nos casos da infecção ocular e dos discos intervertebrais. Nesse período, podem contaminar o ambiente com suas secreções e transmitir bactérias a outros animais suscetíveis e aos humanos. Posteriormente à cura espontânea, os cães apresentam títulos baixos ou negativos e são considerados imunes a reinfeção. Por outro lado, animais tratados com antibioticoterapia, continuam suscetíveis (GREENE & CARMICHAEL, 2015).

Controle e profilaxia

Vacinas comerciais não estão disponíveis para a brucelose canina. Portanto, a prevenção e o controle da doença devem ser baseados na investigação sorológica de cães e canis suspeitos; no tratamento ou eutanásia de animais infectados; e na eliminação do agente no ambiente (SANTOS *et al.*, 2021).

Em canis comerciais afetados pela doença, é recomendada a eutanásia dos cães infectados, desinfecção do ambiente e objetos, e proibição do trânsito de animais (entrada ou saída) até que a enfermidade seja controlada. Caso seja optado pelo tratamento, os animais devem ser retirados da reprodução, castrados e submetidos à antibioticoterapia prolongada. Medidas preventivas incluem a quarentena e testagem de todos os cães adquiridos, além da rejeição de animais com histórico de problemas reprodutivos, ou que sejam oriundos de canis endêmicos (GREENE & CARMICHAEL, 2015).

Os cães domésticos infectados podem receber tratamento ou ser eutanasiados, dependendo da decisão tomada pelo tutor, após receber as devidas orientações sobre o caráter zoonótico da enfermidade. Os animais submetidos a antibioticoterapia devem também ser castrados pois, desse modo, diminuem-se as chances de transmissão da doença. Os tutores devem estar cientes que o tratamento nem sempre resulta em cura, podendo ocorrer recidivas e necessidade de nova antibioticoterapia (GREENE & CARMICHAEL, 2015; SANTOS et al., 2021).

Os cães de rua desempenham papel importante na manutenção da doença no ambiente urbano, uma vez que não há controle sobre sua atividade reprodutiva. Desse modo, medidas de controle populacional em massa são importantes para a prevenção da doença nesse ambiente (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; SANTOS et al., 2021).

A desinfecção e a limpeza do ambiente podem ser realizadas com hipoclorito de sódio (1%), álcool (70%), gluteraldeído, soluções de álcool-iodo, formaldeído e amônio quaternário (GREENE & CARMICHAEL, 2015; SANTOS et al., 2021).

2.2 Aspectos de saúde pública

A infecção nos humanos, em sua grande maioria, ocorre por linhagens lisas, relacionadas aos animais de produção, como: *Brucella melitensis* (cabras e ovelhas), *Brucella suis* (suínos) e *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos) (LAWINSKY et al., 2010; MEGID & MATHIAS, 2016; SOUSA et al., 2017). A *B. melitensis* é considerada a mais virulenta, porém nunca foi reportada no território brasileiro (LAWINSKY et al., 2010); *B. suis* tem virulência intermediária, mas,

mudanças no sistema de manejo das granjas suínas, levaram a diminuição da doença nos plantéis e, conseqüentemente, o número em humanos (LAWINSKY *et al.*, 2010; MEIRELLES-BARTOLI; MATHIAS; SAMARTINO, 2012); *B. abortus* é a menos virulenta dentre as três espécies (LAWINSKY *et al.*, 2010), porém, é considerada de maior importância na saúde pública do Brasil. As linhagens rugosas possuem apenas dois representantes, *B. ovis* (ovinos e caprinos) e *B. canis* (cães e canídeos silvestres). No entanto, apenas *B. canis* tem potencial zoonótico (MEGID & MATHIAS, 2016).

Infecção por *B. abortus* e *B. suis* em humanos

Os bovinos são a principal fonte de infecção de *B. abortus* para os humanos, enquanto os suínos são a principal fonte de *B. suis* (biovars 1 e 3) (MEGID & MATHIAS, 2016). A transmissão zoonótica da bactéria pode ocorrer pelo contato direto ou indireto com animais infectados, por meio do consumo de produtos de origem animal contaminados e pelo contato com vacinas atenuadas (*B. abortus* e RB-51). A doença tem caráter ocupacional e pode afetar trabalhadores da cadeia produtiva da carne e do leite. Esse grupo é representado por ordenhadores, tratadores de animais, magarefes, açougueiros, vacinadores, veterinários e pessoal de laboratório (BRASIL, 2022a). Para a população sem o risco ocupacional, a ingestão de leite e derivados não pasteurizados torna-se a principal forma de transmissão de *B. abortus*, enquanto a ingestão da carne crua ou mal cozida é mais importante na infecção por *B. suis* (MAURELIO *et al.*, 2016; MOR *et al.*, 2016).

A infecção nas pessoas com risco ocupacional pode ocorrer de várias formas, incluindo contato com fetos abortados, restos placentários, secreções ou excreções de animais infectados; por meio de acidentes no momento da vacinação com cepas vivas atenuadas; ou pela inalação de aerossóis contaminados em estábulos, abatedouros ou laboratórios (LIU, 2015). Para prevenir a doença, cuidados devem ser redobrados quanto às medidas de higiene e uso adequado de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras, óculos de proteção e aventais (GREENE & CARMICHAEL, 2015).

A brucelose de origem alimentar deve receber atenção especial, pois as bactérias podem sobreviver por grandes períodos em alimentos contaminados.

Em produtos lácteos não pasteurizados, podem se manter viáveis durante dias até anos: leite (17 dias), leite congelado (>800 dias), queijos crus (até 6 meses), manteiga (até 4 meses), iogurte (2,5 horas até 96 dias, dependendo da temperatura e pH). Sendo assim, uma das principais formas de prevenir a infecção é por meio da ingestão de leite e derivados lácteos submetidos à tratamento térmico, como a cocção (60°C/10 minutos; 71,7°C/15 segundos) (DIVE, 2019).

Estudos recentes atribuem o hábito da caça de suínos selvagens como fator de risco à saúde pública. Os cães de caça podem se infectar durante a caçada ou quando alimentados com carne contaminada de suínos selvagens. Uma vez infectados, podem transmitir o agente aos seus tutores durante a interação homem-animal (RAMAMOORTHY et al., 2011; MOR et al., 2016; JAMES et al., 2017). Recentemente, nova espécie de *Brucella* foi isolada de dois caçadores na Guiana Francesa, denominada *Brucella amazoniensis*. Os autores que propuseram a nova espécie especulam que suínos selvagens das espécies *Pecari tajacu* e *Tayassu pecari* estejam relacionados à cadeia epidemiológica desta espécie, pois ambos os caçadores afirmaram caçar e ingerir a carne de suínos selvagens (ABOUT et al., 2023).

A brucelose humana é distribuída mundialmente, com estimativa de 500.000 novos casos por ano (HULL & SCHUMAKER, 2018). Contudo, por não ser considerada doença de notificação compulsória, não há dados oficiais sobre sua incidência no Brasil (BRASIL, 2022b). Em razão de os animais infectados se constituírem na principal fonte de infecção, acredita-se que o número de casos em humanos acompanhe o número de casos em animais (TULU, 2022). No Brasil, a prevalência dos focos da brucelose bovina varia de 0,9% a 30,6%, a depender do estado analisado. Assim, é provável que muitas pessoas estejam direta ou indiretamente suscetíveis à doença (BRASIL, 2020).

Os sinais clínicos da brucelose nos humanos são inespecíficos, como febre intermitente, mal-estar, sudorese, calafrios, fraqueza, perda de peso e dores em diferentes regiões do corpo. Como esses sinais são comuns a outras doenças, por vezes, são confundidos com outras enfermidades de curso febril, incluindo malária, dengue, Chikungunya, febre tifoide, influenza, entre outras. Em razão

disso, o diagnóstico pode ser dificultoso e demorado, especialmente quando não é possível estabelecer fatores de risco para a doença no histórico do paciente (PAL et al., 2017; FRANÇA, 2021; BRASIL, 2022a; TULU, 2022).

A prevenção da doença em humanos depende do controle e erradicação da enfermidade nos animais. As estratégias adotadas, geralmente, são baseadas no diagnóstico, vacinação, vigilância, controle do trânsito animal e eliminação dos animais infectados (GREENE & CARMICHAEL, 2015; LIU, 2015; PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). No Brasil, as estratégias de controle e eliminação da enfermidade nos rebanhos bovinos se amparam no PNCEBT, que foi estabelecido em 2001. O PNCEBT baseia-se na vacinação em massa de fêmeas bovinas e bubalinas, diagnóstico e sacrifício de animais positivos, além das medidas de controle do trânsito animal. A vacinação é obrigatória para fêmeas, entre 3 a 8 meses de idade quando da utilização da vacina B19, ou a partir de 3 meses de idade, na utilização da RB51. Ressaltando-se que estas são vacinas atenuadas, podendo causar infecção em casos de acidentes. Os animais positivos nos testes sorológicos de triagem (AAT) e confirmatórios (SAL-2ME ou fixação de complemento) devem ser encaminhados ao abate sanitário (BRASIL, 2006).

A brucelose é onerosa aos serviços de saúde e de previdência social pelos custos com diagnóstico, tratamento e afastamento da atividade laboral, por incapacidade momentânea ou permanente, das pessoas acometidas pela doença. No entanto, ainda é considerada como uma doença subdiagnosticada, subnotificada e negligenciada (BRASIL, 2022a).

Infecção por B. canis em humanos

Os cães são a principal fonte de *B. canis* para os humanos (GREENE & CARMICHAEL, 2015). A infecção por esse agente é considerada branda ou assintomática, na maioria dos casos, e esse fato é atribuído a ausência ou baixa quantidade de S-LPS, que resulta em uma espécie menos virulenta do que as amostras lisas (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). As pessoas são consideradas moderadamente resistentes à infecção por *B. canis*. Porém, há relatos da infecção por cepa não-mucoide (M-), que é considerada menos

virulenta do que os isolados de campo (WALLACH *et al.*, 2004; YÜKSEKKAYA; ARAS; UÇAN, 2013).

Os humanos podem se infectar durante o contato direto com animais, secreções e sangue, ou ao manipular o agente em laboratório (WALLACH *et al.*, 2004; DE MASSIS *et al.*, 2022). Na maioria dos casos de infecção por *B. canis*, é possível estabelecer uma relação entre os humanos acometidos e os animais infectados ou as amostras laboratoriais contaminadas (SANTOS *et al.*, 2021). A principal fonte de infecção para os tutores são as cadelas e seus filhotes, durante o parto ou abortamento. Os machos desempenham papel secundário na transmissão para os humanos, porém são importantes na contaminação ambiental por eliminar grande número de bactérias na urina (GREENE & CARMICHAEL, 2015; SANTOS *et al.*, 2021).

A doença pode acometer pessoas que trabalham com cães, incluindo veterinários, funcionários de *pet shops*, adestradores, equipes de resgate de animais, funcionários de canis, *pet sitters* e equipe de laboratório, que representam grupos vulneráveis por exposição ocupacional ao agente (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; KAUFFMAN & PETERSEN, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; DE MASSIS *et al.*, 2022). Crianças, gestantes e imunossuprimidos também estão no grupo de risco para a doença (KAUFFMAN & PETERSEN, 2019).

Os sinais clínicos na brucelose por *B. canis* são inespecíficos, assim como na doença causada por cepas lisas, e incluem febre, cansaço, mal-estar, dores de cabeça, fraqueza, náusea e perda de peso (KAUFFMAN & PETERSEN, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; DE MASSIS *et al.*, 2022). Em casos raros, as manifestações clínicas podem progredir para endocardite, meningite e artrite (GREENE & CARMICHAEL, 2015; DE MASSIS *et al.*, 2022).

O diagnóstico da enfermidade em humanos deve incluir hemocultura e avaliação sorológica (GREENE & CARMICHAEL, 2015; HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; DE MASSIS *et al.*, 2022). Deve-se levar em consideração que a bacteremia intermitente pode resultar em culturas negativas, e que os testes sorológicos usados para o diagnóstico da brucelose canina, quando adaptados para a investigação de anticorpos em soros humanos, devem

ser interpretados de modo cauteloso (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018).

Para prevenir a infecção, os tutores de cães infectados devem ser informados sobre o potencial de transmissão zoonótica da doença, e instruídos quanto às medidas de higiene que devem tomar ao interagir com cães suspeitos, especialmente cadelas com histórico de problemas reprodutivos (GREENE & CARMICHAEL, 2015). As pessoas com risco ocupacional da doença devem ser cuidadosas quanto à higiene, lavando sempre as mãos após manusear animais, e utilizando os equipamentos de proteção individual de modo adequado (GREENE & CARMICHAEL, 2015; COSFORD, 2018; HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). Os cultivos de amostras suspeitas de brucelose devem ser feitos sob condições especiais, por equipe capacitada, em laboratórios com nível 3 de biossegurança (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018; MORTOLA, 2019; DE MASSIS et al., 2022). A desinfecção ambiental com hipoclorito de sódio a 2,5%, amônia quaternária ou álcool 70%, também é importante na prevenção da doença (COSFORD, 2018).

A sintomatologia inespecífica e as limitações dos testes laboratoriais propiciam que a brucelose humana por *B. canis* seja subdiagnosticada. A escassez de estudos de prevalência, e o fato de a doença não ser de notificação obrigatória, tornam o número real de infecções por essa espécie desconhecido. Desse modo, é difícil determinar a importância da infecção por essa espécie na saúde pública, apesar de a literatura indicar que a enfermidade pode estar sendo negligenciada (SANTOS et al., 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de *Brucella* spp. em cães e moradores de ilhas oceânicas (Superagui, Mel e Peças) e do litoral continental de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil.

3.1 Objetivos específicos

- Investigar a presença de anticorpos anti-*Brucella canis* em soros de cães e humanos, utilizando o Teste de Aglutinação em Microplacas com 2-Mercaptoetanol (MAT-2ME) e ensaio imunocromatográfico;
- Investigar a presença de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella suis* em soros de cães e humanos, utilizando o protocolo recomendado pelo PNCEBT;
- Realizar a pesquisa direta do agente em sangue de cães e humanos, nos casos reagentes na sorologia, utilizando PCR gênero-específica;
- Analisar os resultados obtidos nos testes diagnósticos com base nas características da população estudada, numa abordagem comparativa entre a população das ilhas e do litoral continental, levando em consideração aspectos de saúde pública.

CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo enviado para a revista *Frontiers in Veterinary Medicine*, cujas normas para elaboração podem ser encontradas em:

<https://www.frontiersin.org/journals/public-health/for-authors/author-guidelines>.

Serological and Molecular Investigation of *Brucella* Species in Humans and Dogs Living on Island and Mainland Seashore Areas of Brazil

Noelia Layslla Costa Barros¹, Matheus Lopes Ribeiro¹, Aaronson Ramathan Freitas³, Ruana Renostro Delai², Louise Bach Kmetiuk³, Wanderson Sirley Reis Teixeira¹, Camila Michele Appolinario¹, Claudia Turra Pimpão², Claire Ponsart⁴, Acacia Ferreira Vicente⁴, Alexander Welker Biondo^{3*}, Jane Megid^{1*}

¹Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

²Department of Animal Science, School of Life Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Curitiba, Brazil

³Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁴French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), National/EU/WOAH Reference Laboratory for brucellosis, Maisons-Alfort, France

* Correspondence:

Corresponding Author

jane.megid@unesp.br

abiondo@ufpr.br

Keywords: brucellosis, zoonosis, *Brucella canis*, *Brucella abortus*, public health.

Abstract

Although *Brucella abortus*, *Brucella suis* and *Brucella canis* may infect humans and dogs, no study to date has assessed humans and their dogs from island and mainland seashore areas. To achieve this objective, this study used serological tests (Microplate Agglutination Test with 2- Mercaptoethanol, immunochromatographic assay, and Rose Bengal Test) and a *Brucella* genus-specific PCR assay. No seropositivity to *B. abortus* and *B. suis* was detected in human or dog sera. Anti-*B. canis* seropositivity was observed in 3/148 (2.0%) dogs, but none of the human samples were positive to *B. canis*. In addition, all of samples, from both species, were negative on *Brucella* genus-specific PCR assay. The seropositive dogs lived on the seashore mainland area (Guaraqueçaba city), though they were not related. The absence of seropositivity on the islands and the low seropositivity on the seashore mainland could be attributed to geographic isolation and suggest the low impact of the disease in the region. Despite the absence of seropositive owners, the presence of seropositive dogs indicates the need for preventive measures to avoid anthroponotic transmission of the pathogen.

1 Introduction

The human-animal relationship has undergone several changes since the domestication process until nowadays. Dogs were probably the first animal species to be domesticated, as they approached humans searching for food, and since then, they have played a special role in human life. In the early days of this relationship, they performed instrumental functions such as helping with hunting or guarding the territory (1). In parallel to that, other species were also domesticated with the aim of providing food, clothing, and

traction force (2). Thousands of years later, people continue living with dogs for emotional reasons and farm animals are still being used for livestock and work purposes (1,2). The strengthening of the human-animal relationship provided mutual benefits throughout time; however, it also increased the risk of zoonotic disease transmission (3).

Brucellosis affects both humans and animals, and for that reason is considered a zoonosis (4). The disease is caused by gram-negative bacteria of the *Brucella* genus, which contains several species, some of them well known for causing undulant fever in humans and reproductive disorders in animals, while others have an undetermined importance in human and animal health (5,6). Although *Brucella* species have a preferred host, they are not species-specific and may infect other species through direct or indirect contact with infected animals (4). Domestic animals are the preferential hosts of the following *Brucella* species: *Brucella melitensis* (goats and sheep), *Brucella suis* biovar 1 and 3 (pigs), *Brucella abortus* (cattle and buffaloes), *Brucella ovis* (sheep) and *Brucella canis* (dogs) (4,6,7). Considering classical *Brucella* species, humans and dogs can be infected by *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* and *B. canis* (8,9). Nonetheless, in Brazil, *B. melitensis* has never been reported (10).

In humans, brucellosis caused by *B. suis* and *B. abortus* is considered primarily an occupational disease, affecting workers in contact with infected livestock animal and their contaminated tissues (11,12). For people without occupational exposure to the bacteria, foodborne infection, through the consumption of contaminated products of animal origin, is more important in disease transmission (11). Dogs can also be infected with *B. abortus* or *B. suis* through contact with infected livestock and their products or secretions (13,14). Nevertheless, the disease is considered underdiagnosed, underreported, and neglected, according to health organizations (8,15).

B. canis is well known as the agent of canine brucellosis, but the bacteria can also infect people during human-animal interaction (16). The transmission of the disease between dogs is usually associated with reproduction, especially through breeding and contact with aborted fetuses and vaginal discharge, but other biological fluids (blood, semen, and urine) could contain bacteria and be infection sources as well (16,17). Humans are also susceptible to *B. canis* infection, through direct or indirect contact with infected dogs and their contaminated secretions, although this zoonotic potential is often neglected and underrecognized (16,17). Furthermore, the nonspecific signs of the disease and the specificity of serological diagnostic tests to smooth lipopolysaccharide in smooth strains (e.g., *B. abortus*), which do not cross-react with rough lipopolysaccharide in rough strains (e.g., *B. canis*), may partially explain the underdiagnosis of the disease in humans (4,17).

Thus, due to the importance of human and animal brucellosis and the lack of studies in the regions of the oceanic islands and the seashores mainland of Brazil, the present study aimed to investigate the occurrence of the etiological agent of the disease (especially *B. suis*, *B. abortus* and *B. canis*) in these regions.

2 Materials and Methods

2.1 Ethics

This study was approved by the Ethics Committee in Human Health at the Brazilian Ministry of Health (protocol 46994521.0.0000.0102) and the Ethics Committee of Animal Use of the Federal University of Parana (protocol number 036/2021).

2.2 Study design

A cross-sectional serological and molecular study aiming to investigate the circulation of *Brucella abortus*, *Brucella suis* and *Brucella canis* in humans and dogs living on oceanic islands and seashore mainland city of Paraná State, southern Brazil. The study was conducted from December 2019 through February 2020.

2.3 Local of study

This study was conducted on three oceanic islands, Ilha do Mel Island, Superagui Island and Peças Island considered as environmentally protected conservation units and the seashore mainland area of the Guaraqueçaba city, all of them located in the Paraná State, southern Brazil (Table 1). The main sources of income are tourism (Ilha do Mel Island), fishing and craft activity (Superagui Island and Peças Island), although ecological tourism has increased in the last years, neither island has adequate infrastructure for health, education, basic sanitation, difficult accessibility or other services. In addition, most supplies are shipped from the mainland (18,19).

The seashore area of the Guaraqueçaba city, also an area of environmental preservation and semi-isolated, due to difficult land and sea access, was sampled for mainland comparison (18,19). All sampled sites are located within the largest continuous remnant of Atlantic Forest in Brazil.

2.4 Blood sample collection

People and dogs were selected for convenience, during actions of population management of domestic animals developed by the “Barco Saúde Única” volunteer project in above cited areas. Dog’s owners were informed about the research when brought their dogs to be cared for in the project, and blood samples were collected from people and their dogs, after agreeing to participate in the study. People who have contact with dogs, but do not own them themselves, were also sampled. Human blood samples were collected by cephalic venipuncture, and canine blood samples were collected by external jugular venipuncture. Each blood sample was placed in two sterile vacuum tubes, one containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and another containing a serum separator gel. EDTA blood samples were frozen at -80°C. Whole blood samples in tubes containing separator gel were kept at room temperature (25°C) until clot retraction, centrifuged at 800g for 5 minutes to separate serum, and then, only the serum was kept at -20°C until processing. All sera collected from humans (n = 195) and their dogs (n = 148) were submitted to serological tests (RBT - Rose Bengal Test and 2ME-MAT - Microplate Agglutination Test with 2-Mercaptoethanol). Sera with a titer equal to 20 (n = 49) or higher, in the 2ME-MAT test, were submitted to a standardized immunochromatographic assay and a molecular test (*Brucella* genus-specific PCR).

2.5 Serological tests

Serological tests that use cell wall antigens do not show cross-reaction between smooth and rough *Brucella* species, demanding specific tests for each strain type (17). This was taken into consideration in the methodology of this study.

To detect anti-*Brucella abortus* and anti-*Brucella suis* antibodies, the qualitative Rose Bengal Test (RBT) was performed following the recommendations of the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). The antigen used consisted of an inactivated suspension of *Brucella abortus* strain 1119-3, stained by Rose Bengal, and diluted 8.0% in buffer solution (pH 3.65) (20).

To detect anti-*Brucella canis* antibodies, an association of the Microplate Agglutination Test with 2- Mercaptoethanol (2ME-MAT) and the immunochromatographic assay was used (21,22).

The 2ME-MAT was performed according to the protocol of the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'Alimentation, de L'Environnement et du Travail (ANSES, Maisons-Alfort, France), which is the National/ European Union/ WOAHA (World Organisation for Animal Health) reference laboratory for brucellosis. The assay used *B. canis* antigen and was conducted in six dilutions from 1:20 to 1:640. Sera with an agglutination titer equal or greater than 20 were considered reagent, conforming previous study (21). The immunochromatographic assay was performed according to the manufacturer (Anigen Rapid C.Brucella Ab Test Kit, Bionote Inc., Korea) and *B. canis* antigens were used as a capture and detector in the assay (23). A sample was considered positive for *B. canis* when reagent to 2ME-MAT and positive to immunochromatographic assay.

2.6 Molecular tests

Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) was chosen to detect the genus *Brucella*. A pool of two samples of the same species (human or canine) and the same location was used to reduce expenses. When grouping in pairs was not possible, because the total sampled was not an even number, the samples were tested individually. Whole blood samples were used for genomic DNA extraction according to the manufacturer's protocol (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation®). DNA amplification was performed using a specific set of primers designed to detect *Brucella* spp. (ITS66: ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA and ITS279: AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC), according to previously described methodology (24). The samples were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and then stained with SYBR® Safe DNA gel stain (S33102).

2.7 Data collection

A questionnaire was applied to people who agreed to participate in the study (n = 195). The humans answered about their gender, age, education level, dog ownership, household income, and address. The owners also informed the gender, age, breed, and origin of their dogs. Inconsistencies in the information provided by the owners were disregarded in the analysis. Data was correlated to positive serological results.

3 Results

A total of 195 human samples were collected, with 101/195 (51.8%) from islands and 94/195 (48.2%) from seashore mainland. All samples were seronegative or negative to *B. abortus*, *B. suis* or *B. canis*.

Most of the people who participated in the study were female adults, with secondary education or higher, earned more than one minimum wage per month, were dog owners, and did not eat raw or undercooked meat. Although a minority, those who consumed raw or undercooked meat ate, among other meats, beef, pork, and game meat (Table 2).

A total of 148 dog samples were collected, with 58/148 (39.2%) from islands and 90/148 (60.8%) from seashore mainland. For serological tests, 3/148 (2.0%) dogs from mainland area were seropositive to *B. canis*, and all were seronegative for *B. abortus* or *B. suis*. All samples were negative for *Brucella* genus-specific PCR assay. The sampled owners of *B. canis* seropositive dogs were seronegative, but there are uninvestigated contacts whose serological status is unknown (Table 3).

Most of the sampled dogs were not-breed female adults, adopted, rescued, or gifted to their owners. Few had access to the street or the forest and consumed raw or undercooked meat, including beef, pork, and game meat. In contrast, the majority hunted animals, among which wild swine (Tabela 4).

4 Discussion

To our knowledge, this is the first comparative study of *Brucella* spp. exposure and infection in humans and their dogs from islands and seashore mainland.

In the present study, all human samples were seronegative and negative for *Brucella* spp., diverging from the estimated prevalence of 15.53% in the general population worldwide (25). Cattle are the preferred host of *B. abortus*, while pigs are the preferred host of *B. suis* (biovar 1 and 3) (4,6,7). The bacteria can be transmitted from infected animals to humans by direct or indirect contact with those animals or their products (26). Human brucellosis caused by this species is primarily an occupational disease of those working with infected animals, their contaminated biological material, or attenuated anti-*Brucella* vaccines (12). These worker groups can be listed as farmers, shepherds, animal handlers, butchers, abattoir workers, laboratory workers, veterinarians, and veterinary assistants (12,27,28). Another form of transmission, more important for people without the occupational risk of the disease, is through the consumption of contaminated animal products (11). For *B. abortus*, the infection is more often associated with the consumption of unpasteurized dairy products (milk and cheese), and less commonly with undercooked meat (29,30). Whereas, for *B. suis*, the ingestion of contaminated undercooked meat and derivatives, such as ham, is more important (31). The humans sampled herein are not part of the risk group for occupational brucellosis, as they work primarily with handicrafts, fishing, and tourism (18,19). Moreover, we speculate that geographical isolation makes the informal trade of milk and dairy products difficult. The authors believe that the inhabitants of these locations consume milk and derivatives processed by the industry, such as UHT (Ultra High Temperature) or pasteurized milk, and commercialized in local markets. This dynamic is even more pronounced on the Islands, as it requires transport

by sea, which makes the logistics of transporting perishable products even more complex. In addition, although some humans eat raw or undercooked meat from cattle (61/193) and pigs (15/193), none of them tested positive to *B. abortus* or *B. suis*, indicating the low impact of the disease in humans living in the region. Thus, although the presence of backyard livestock, human reports of close contact with their dogs, and hunting habits, the negative results herein suggest the low circulation of *Brucella* spp. in such areas.

The dog seropositivity (3/148; 2.0%) was within worldwide seroprevalence range for *B. canis* from 1% to 28% (17). *B. canis* has been recognized as the most common species which infects dogs and is a public health concern due their close contact with humans (16). Dog-to-dog transmission occurs predominantly through breeding and contact with the reproductive secretions (placenta, fetal tissues and vaginal discharges resulting from abortion) of an infected animal because of the great amount of bacteria eliminated on those (9). Dogs can also shed bacteria in their blood, milk, nasal secretions, and urine, but infections through contact with those biological materials are less common (9,10,17,32). In addition, stray and non-neutered dogs may be more likely to be seropositive than owned dogs (17). Although the relatively low seroprevalence herein, these results highlighted spillover into the human population, due to the higher burden and intermittent character of canine brucellosis in the stray/roaming dog populations could lead (17).

Dog-to-human transmission may occur through direct contact with infected dogs or their contaminated secretions, and has been estimated that only 1% of diagnosed human brucellosis are due to *B. canis* (16,33). Although underestimated, transmission to humans has been considered occasional and usually associated with close contact with dogs, affecting especially kennel keepers and owners of sick or asymptomatic carrier dogs (34,35); besides dog-to-human transmission may not occur because humans are relatively resistant to *B. canis* infection (9).

Dogs closely associated with infected livestock or wildlife occasionally can be infected with *B. abortus* or *B. suis* (14,36). Foodborne infection can also occur, especially through the consumption of raw milk and uncooked meat (14,37). Although hunting habits and intake of raw or undercooked meat were respectively recorded in 61.3% (84/137) and 26.5% (39/147) of the dogs herein, no seropositivity or positivity for *B. abortus* or *B. suis* were found. These results corroborate with another study conducted on Fernando de Noronha Island (38). Apparently, the sampled dogs, just like their owners, are not related to infected livestock animals and probably have not ingested contaminated animal products or derivatives. Therefore, infection with those *Brucella* species is unlikely.

Laboratory tests are essential for the definitive diagnosis of brucellosis, due to the non-specific signs of this disease (4,16). In case of infection with *Brucella* spp., the isolation and identification of the agent are the gold standards for diagnosis. However, this is a risky procedure considering its zoonotic potential for laboratory personnel, and false negative results are common due to the difficulties in this test (16). Unfortunately, many factors contribute to the low sensitivity of isolation, including *B. canis* concentration in the collected sample; intermittent shedding of bacteria; poor quality samples; fastidious forms; slow growth; incorrect culture media; and using of EDTA as anticoagulant in blood samples, instead of heparin or sodium citrate, which inhibits bacterial growth (16,32,39). For those reasons, serological tests are commonly used in the surveillance of

human and animal brucellosis (4). The available serological tests used to detect smooth *Brucella* species do not cross-react with rough *Brucella* species, demanding specific tests, which were applied in the present study (17).

The PCR test did not detect *Brucella* spp. DNA in the blood of the seropositive individuals. The non-agreement between serological and molecular test results can be credited to by the absence of bacteremia during blood collection. Bacteremia in *B. canis* infection is prolonged, but intermittent, and usually disappears in chronic infections, so the agent may not be recovered from the blood (40). Seroconversion, without detection of bacterial DNA, could be explained by a competent immune response to a pathogenic challenge, usually mediated by T helper 1 lymphocytes (32). Another possibility is that the results are false positives, due to nonspecific cross-reactions with shared surface antigens of microorganisms, particularly gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli*) (32, 41-43). Due to the possibility of false positive results (16), the association of serological tests, as suggested in another study (21), was used here to target the greater reliability of the results. In view of the potential of zoonotic transmission and the risk of disease spread in the dog population, the positive results cannot be ignored. Ideally, a follow-up investigation in the family of the seropositive dogs should be conducted, including the collection of biological samples in different times for diagnostic purposes.

5 Study limitations

At the time of sample collection and application of the questionnaire, a different set of zoonotic pathogens were aimed, and only after it was decided to expand the number of infectious agents investigated, which are also relevant in public health, as *Brucella*. For this reason, important questions about the risk factors for brucellosis that could elucidate the present result were not included in the questionnaire. Besides that, the return to the areas where samples were collected is not feasible due to logistics and a lack of financial resources.

6 Conclusions

The present study showed the absence of seropositivity to *Brucella abortus* and *Brucella suis* in humans and dogs, besides the absence of seropositivity to *Brucella canis* in humans, and low seropositivity in their dogs. Nevertheless, no active infection was confirmed by PCR test. All the seropositive dogs lived on the seashore mainland area (Guaraqueçaba city), though they were not related. The absence of seropositivity on the islands and the low seropositivity on the seashore mainland could be attributed to geographic isolation and suggest the low impact of the disease in the region. Despite the absence of seropositive owners, the presence of seropositive dogs indicates the need for preventive measures to avoid anthroozoonotic transmission of the pathogen.

7 References

1. De Souza Cabral FG, Savalli C. Sobre a relação humano-cão. *Psicologia USP* (2020) 31: doi: 10.1590/0103-6564E190109
2. Wallach O. Timeline: The Domestication of Animals. (2022) <https://www.visualcapitalist.com/the-domestication-of-animals/> [Accessed December 31, 2022]
3. Lima M de CF, Mittestainer JC, Rocha PB, Carvalho ER, Verotti B do P, Pellicciari PR, Victoria C, Langoni H. Principais zoonoses em pequenos animais: breve revisão. *Veterinária e Zootecnia* (2022) 24:84–106. doi: 10.35172/rvz.2017.v24.708
4. Hull NC, Schumaker BA. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect Ecol Epidemiol* (2018) 8: doi: 10.1080/20008686.2018.1500846
5. Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, Gronow S, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* (2020) 11: doi: 10.3389/fmicb.2020.00468
6. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int J Vet Sci Med* (2018) 6:S31–S35. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
7. Sousa MGS, Salvarani FM, Bomjardim HA, Brito MF, Barbosa JD. Brucellosis in water buffaloes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* (2017) 37:234–240. doi: 10.1590/S0100-736X2017000300006
8. Lawinsky ML de J, Ohara PM, Elkhoury M da R, Faria N do C, Cavalcante KRLJ. Estado da arte da brucelose em humanos. *Rev Panamazonica Saude* (2010) 1:75–84. doi: 10.5123/s2176-62232010000400012
9. Greene CE, Carmichael LE. “Brucelose canina.” *Doenças infecciosas em cães e gatos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2015). p. 862–889
10. Megid J, Mathias LA. “Brucelose.” *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca (2016). p. 21–55
11. Lytras T, Danis K, Dounias G. Incidence Patterns and Occupational Risk Factors of Human Brucellosis in Greece, 2004–2015. *Int J Occup Environ Med* (2016) 7:221. doi: 10.15171/IJOEM.2016.806
12. Pereira CR, de Almeida JVFC, de Oliveira IRC, de Oliveira LF, Pereira LJ, Zangerônimo MG, Lage AP, Dorneles EMS. Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14:1–19. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0008164
13. Xavier MN, Costa ÉA, Paixão TA, Santos RL. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciência Rural* (2009) 39:2252–2260. doi: 10.1590/S0103-84782009005000167

14. Mor SM, Wiethoelter AK, Lee A, Moloney B, James DR, Malik R. Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: clinical findings and implications for zoonotic transmission. *BMC Vet Res* (2016) 12: doi: 10.1186/S12917-016-0835-0
15. Corbel MJ, World Health Organization., Food and Agriculture Organization of the United Nations., International Office of Epizootics. *Brucellosis in Humans and Animals*. World Health Organization (2006). 102 p.
16. Santos RL, Souza TD, Mol JPS, Eckstein C, Paixão TA. Canine Brucellosis: An Update. *Front Vet Sci* (2021) 8: doi: 10.3389/fvets.2021.594291
17. Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerg Infect Dis* (2018) 24:1401–1406. doi: 10.3201/eid2408.171171
18. Freitas AR, Delai RR, Kmetiuk LB, da Silva EC, Martini R, Brandão APD, Giuffrida R, de Barros-Filho IR, Costa da Silva R, Langoni H, et al. Seropositivity of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Owners and Their Dogs Living on Island and Mainland Seashore Areas of Southern Brazil. *Trop Med Infect Dis* (2022) 7: doi: 10.3390/tropicalmed7100252
19. Delai RR, Freitas AR, Kmetiuk LB, Meriguetti YFFB, Ferreira IB, Lescano SAZ, Gonzáles WHR, Brandão APD, de Barros-Filho IR, Pettan-Brewer C, et al. One Health approach on human seroprevalence of anti-*Toxocara* antibodies, *Toxocara* spp. eggs in dogs and sand samples between seashore mainland and island areas of southern Brazil. *One Health* (2021) 13: doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100353
20. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2006)190. www.agricultura.gov.br
21. De Massis F, Sacchini F, Averaimo D, Garofolo G, Lecchini P, Ruocco L, Lomolino R, Santucci U, Sgariglia E, Crotti S, et al. First Isolation of *Brucella canis* from a breeding kennel in Italy. *Vet Ital* (2021) 57:215–226. doi: 10.12834/VETIT.2497.15848.1
22. Barbuddhe SB, Vergis J, Rawool DB. Immunodetection of bacteria causing brucellosis. *Methods in Microbiology* (2020) 47:75–115. doi: 10.1016/BS.MIM.2019.11.003
23. BIONOTE.
<https://www.bionote.co.kr/en/product/rapid/view.html?idx=62#list01> [Accessed March 25, 2023]
24. Keid LB, Soares RM, Vieira NR, Megid J, Salgado VR, Vasconcellos SA, da Costa M, Gregori F, Richtzenhain LJ. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Vet Res Commun* (2007) 31:951–965. doi: 10.1007/s11259-006-0109-6
25. Khoshnood S, Pakzad R, Koupaei M, Shirani M, Araghi A, Irani GM, Moradi M, Pakzad I, Sadeghifard N, Heidary M. Prevalence, diagnosis, and manifestations of

brucellosis: A systematic review and meta-analysis. *Front Vet Sci* (2022) 9: doi: 10.3389/FVETS.2022.976215/FULL

26. Tuon FF, Cerchiari N, Cequinel JC, Droppa EEH, Moreira SDR, Costa TP, Navarro A de PB, Handar AM, Souza MN de, Brucellosis Workgroup. Guidelines for the management of human brucellosis in the State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* (2017) 50:458–464. doi: 10.1590/0037-8682-0319-2016

27. Mangalgi SS, Sajjan AG, Mohite ST, Gajul S. Brucellosis in Occupationally Exposed Groups. *J Clin Diagn Res* (2016) 10:DC24. doi: 10.7860/JCDR/2016/15276.7673

28. Mia MM, Hasan M, Pory FS. Occupational exposure to livestock and risk of tuberculosis and brucellosis: A systematic review and meta-analysis. *One Health* (2022) 15:100432. doi: 10.1016/J.ONEHLT.2022.100432

29. Casalnuovo F, Ciambrone L, Cacia A, Rippa P. Contamination of Bovine, Sheep and Goat Meat with *Brucella* Spp. *Ital J Food Saf* (2016) 5:5913. doi: 10.4081/IJFS.2016.5913

30. Béjaoui A, ben Abdallah I, Maaroufi A. *Brucella* spp. Contamination in Artisanal Unpasteurized Dairy Products: An Emerging Foodborne Threat in Tunisia. *Foods* 2022, Vol 11, Page 2269 (2022) 11:2269. doi: 10.3390/FOODS11152269

31. Shanson DC. “Zoonoses.” *Microbiology in Clinical Practice*. Butterworth-Heinemann (1989). p. 507–532 doi: 10.1016/B978-0-7236-1403-6.50031-4

32. Cosford KL. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *The Canadian Veterinary Journal* (2018) 59:74. /pmc/articles/PMC5731389/ [Accessed February 16, 2023]

33. Angel MO, Ristow P, Ko AI, Di-Lorenzo C. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil. *J Infect Dev Ctries* (2012) 6:675–679. doi: 10.3855/JIDC.2347

34. Rodrigues RTGA, Bezerra JAB, Medeiros VB, Filgueira KD. Brucelose canina: uma revisão prática para o clínico veterinário de pequenos animais. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Anima* (2017) 11:216–232.

35. Suzuki EY, Penha G de A, Ueda F dos S, Salvarani R de S, Alves ML, Zappa V. Brucelose canina: revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* (2008) 10: www.revista.inf.br-www.editorafaef.com.br-www.faef.br.

36. Mortola E. *Brucella Abortus* in Dog Population: An Underestimated Zoonotic Disease. *Biomed J Sci Tech Res* (2019) 15: doi: 10.26717/BJSTR.2019.15.002681

37. Wareth G, Melzer F, El-Diasty M, Schmoock G, Elbauomy E, Abdel-Hamid N, Sayour A, Neubauer H. Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms. *Transbound Emerg Dis* (2017) 64:e27–e30. doi: 10.1111/tbed.12535

38. Almeida EC de, Souza MMA de, Filho CDFL, Magalhães FJR, Pontual KAQ, Fonsêca FS, Marvulo MFV, Dias RA, Ferreira F, Neto JSF, et al. Survey of bovine

brucellosis on the island of Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* (2022) 59:e191425–e191425. doi: 10.11606/ISSN.1678-4456.BJVRAS.2022.191425

39. De Massis F, Sacchini F, Petrini A, Bellucci F, Perilli M, Garofolo G, Savini G, Tittarelli M. Canine brucellosis due to *Brucella canis*: description of the disease and control measures. *Vet Ital* (2022) 58:5–23. doi: 10.12834/VETIT.2561.16874.1

40. Fernandes AR da F, Kim P de CP, Dantas SB de A, Mota RA, Azevedo SS. Detecção de DNA de *Brucella* spp. em amostras de sangue e de suabe vaginal ou prepucial de cães do município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil Detection of *Brucella* spp. DNA in samples of blood and vaginal or preputial swab from dogs in the county of Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Vet Res Anim Sci* (2013)206–210.

41. De Massis F, Sacchini F, Petrini A, Bellucci F, Perilli M, Garofolo G, Savini G, Tittarelli M. Canine brucellosis due to *Brucella canis*: description of the disease and control measures. *Vet Ital* (2022) 58:5–23. doi: 10.12834/VETIT.2561.16874.1

42. Kauffman LK, Petersen CA. Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* (2019) 49:763–779. doi: 10.1016/J.CVSM.2019.02.013

43. Mol JPS, Guedes ACB, Eckstein C, Quintal APN, Souza TD, Mathias LA, Haddad JPA, Paixão TA, Santos RL. Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *J Vet Diagn Invest* (2020) 32:77–86. doi: 10.1177/1040638719891083

8 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

9 Author Contributions

AW, CM, JM, RR, AR, NL and AF contributed to conception and design of the study. NL organized the database. NL wrote the first draft of the manuscript. AW, CM, JM, RR, AR, NL, LB, CT, ML, WS, CP and AF wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

10 Funding

This research received no external funding.

11 Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

12 Figures

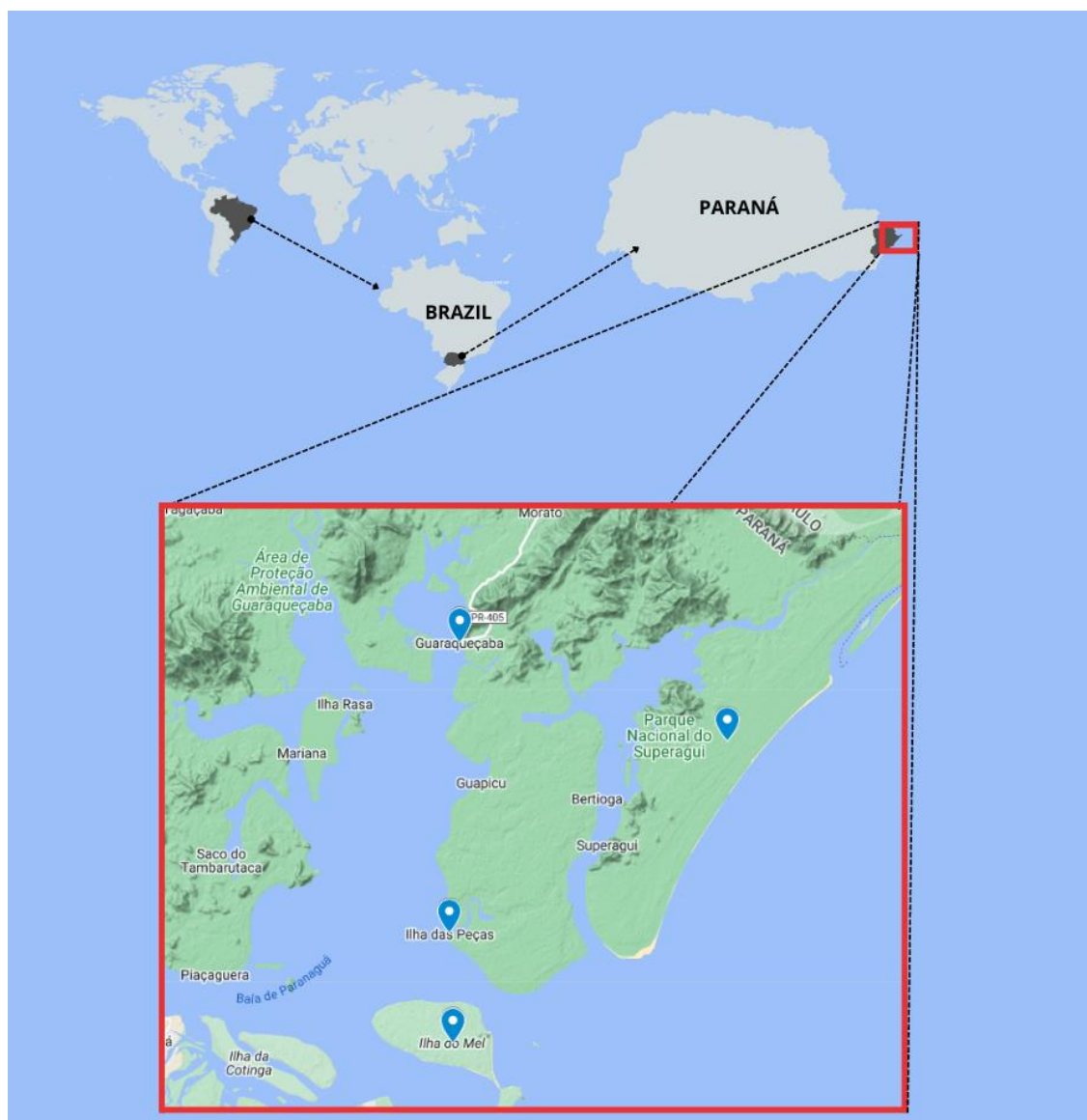


FIGURE 1. The study area location. The maps were created with mapchart.net and google.com.br/maps and adapted by the authors.

13 Tables

TABLE 1. Coordinates, total of human population and number of samples of dogs and humans, collected in each locality.

Location	Coordinates	Population	Human sampling	Dog sampling
Islands				
Mel	25°34'12"S 48°18'57"W	1094	68	29
Superagui	25°27'19"S 48°14'50"W	700	5	0
Peças	25°27'22"S 48°20'07"W	350	28	29
Mainland				
Guaraqueçaba	25°18'25"S 48°19'44"W	2182*	94	90
Total			195	148

* Considered only inhabitants of the mainland port area, as Guaraqueçaba city had an overall estimated 7594 inhabitants at the time.

TABLE 2: Characteristics of the human sampling population.

Variables	Population		
	N	Total	%
Household location			
Island	101	195	51.8%
Mainland	94	195	48.2%
Age (years)			
<18	6	191	3.1%
≥18	185	191	96.9%
Gender			
Female	122	193	63.2%
Male	71	193	36.8%
Education level			
≤Elementary school	58	193	30.1%
>Elementary school	135	193	69.9%
Income			
≤1 minimum wage	53	185	28.6%
>1 minimum wage	132	185	71.4%
Dog owner			
No	26	193	13.5%
Yes	167	193	86.5%
Eat raw or undercooked meat			
No	125	193	63.7%
Yes*	68	193	35.2%

* Eat raw or undercooked meat of beef (n = 61), pork (n = 15), poultry (n = 15), fish (n = 36) or game meat (n = 3).

TABLE 3: Characteristics of seropositive dogs.

	Dog 1	Dog 2	Dog 3
Sex	Male	Female	Female
Age	5 years old	8 years old	4 years old
Breed dog	No	No	No
Street access	Yes	No	No
Dog acquisition	Gifted	Gifted	Gifted
Contacts	3 humans	5 humans 1 dog	2 humans
Sampled owner characteristics	Woman 45 years old Incomplete elementary education	Man 40 years old High school education	Woman 23 years old Incomplete higher education

TABLE 4: Characteristics of the dog sampling population.

Variables	Population		
	N	Total	%
Household location			
Island	58	148	39.2%
Mainland	90	148	60.8%
Age (years)			
<10	97	120	80.8%
≥10	23	120	19.2%
Gender			
Female	75	147	51.0%
Male	72	147	49.0%
Dog aquisition			
Adoption/Rescue/Gift	125	147	85.0%
Purchase	16	147	10.9%
Other	6	147	4.1%
Street access			
Yes	57	147	38.8%
No	90	147	61.2%
Breed dog			
Yes	33	143	23.1%
No	110	143	76.9%
Eat raw or undercooked meat			
No	108	147	73.5%
Yes*	39	147	26.5%
Forest access			
No	82	147	55.8%
Yes	65	147	44.2%
Hunt animals			
No	53	137	38.7%
Yes**	84	137	61.3%

* Eat raw or undercooked meat of beef (n = 32), pork (n = 8), poultry (n = 16), fish (n = 11) or game meat (n = 1).

**The animals hunted are rodents, birds, lizards, possums, insects, wild pigs (*Pecari tajacu*), cats, snails, geese, bats, hedgehogs, snakes, anteaters, and wild birds (*Penelope spp.*).

CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Discussão geral

No presente estudo, todas as amostras humanas foram negativas para *Brucella* spp., divergindo da prevalência estimada de 15,53% na população mundial (KHOSHNOOD *et al.*, 2022).

A transmissão do agente para os humanos pode ocorrer durante o contato, direto ou indireto, com animais infectados ou pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (TUON *et al.*, 2017). A brucelose humana causada por estes agentes é, principalmente, uma doença ocupacional devido à contato com animais infectados, com seus tecidos ou fluídos biológicos contaminados ou com vacinas anti-*Brucella* atenuadas (PEREIRA *et al.*, 2020). Esse grupo de trabalhadores tem por representantes os pecuaristas, ordenhadores, vacinadores, tratadores de animais, açougueiros, magarefes, pessoal de laboratório, veterinários e auxiliares de veterinário (MANGALGI *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2020; MIA; HASAN; PORY, 2022).

Outra forma de transmissão, mais importante para pessoas sem o risco ocupacional da doença, é pelo consumo de produtos de origem animal contaminados (LYTRAS; DANIS; DOUNIAS, 2016). Para *B. abortus*, a infecção é mais frequentemente associada ao consumo de laticínios não-pasteurizados (leite e queijo) e, menos comumente, à carne crua ou malcozida (CASALINUOVO *et al.*, 2016; BÉJAOUÏ; BEN ABDALLAH; MAAROUFI, 2022). Já para *B. suis*, a ingestão de carne malcozida e derivados, como o presunto, é mais importante na transmissão (SHANSON, 1989).

Os humanos amostrados não fazem parte do grupo de vulnerabilidade para brucelose ocupacional, pois trabalham principalmente com artesanato, pesca e turismo (DELAI *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022). Além disso, os autores especulam que o isolamento geográfico dificulta o comércio informal de leite e derivados. Acredita-se que os habitantes dessas localidades consomem leite e derivados processados pela indústria, como UHT (Ultra High Temperature) ou leite pasteurizado, comercializados nos mercados locais. Esta dinâmica é ainda mais acentuada nas ilhas, pois exige transporte marítimo, o que torna ainda mais complexa a logística de transporte de produtos perecíveis. Ademais, embora

alguns humanos consomem carne crua ou malcozida de bovinos (61/193) e suínos (15/193), nenhum foi positivo para *B. abortus* ou *B. suis*, indicando o baixo impacto da doença nos humanos que vivem na região. Assim, embora exista a presença de um pequeno número de bovinos nas áreas estudadas, relatos de contato próximo entre humanos e seus cães, além de hábitos de caça, os resultados negativos aqui encontrados sugerem a baixa circulação de *Brucella* spp. na região estudada.

A soropositividade canina (3/148; 2,0%) está dentro da faixa de soroprevalência mundial para *B. canis*, de 1% a 28% (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). *B. canis* têm sido reconhecida como a espécie mais importante na brucelose canina e pode ser um problema de saúde pública devido ao contato próximo entre cães e humanos (SANTOS *et al.*, 2021). A transmissão entre cães ocorre, predominantemente, durante o acasalamento ou por meio do contato com as secreções reprodutivas decorrentes do abortamento (placenta, tecidos fetais, descargas vaginais e feto abortado), pela grande quantidade de bactérias eliminadas (GREENE & CARMICHAEL, 2015). Os cães também podem eliminar bactérias no sangue, leite, saliva, fezes, secreções nasais e urina, mas as infecções por contato com esses materiais são incomuns (GREENE & CARMICHAEL, 2015; MEGID & MATHIAS, 2016; COSFORD, 2018; HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). Além disso, cães errantes e não castrados podem ser mais propensos a soropositividade do que cães tutorados (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018). Embora a soroprevalência tenha sido relativamente baixa, existe a possibilidade de transmissão da infecção canina para a população humana, pela alta carga de bactérias que pode ser eliminada e a natureza intermitente da brucelose canina (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018).

A transmissão do cão para os humanos pode ocorrer pelo contato direto com cães infectados ou suas secreções contaminadas, e é estimado que apenas 1% da brucelose humana seja causada por *B. canis* (ANGEL *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2021). A transmissão é considerada rara e, quando ocorre, geralmente está associada ao contato próximo com cães, afetando especialmente donos de canis e tutores de cães doentes ou portadores assintomáticos (SUZUKI *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2017). Além disso,

mesmo em contato com o agente, os humanos podem não ser infectados por serem relativamente resistentes à infecção por *B. canis* (GREENE & CARMICHAEL, 2015).

Cães em contato próximo com animais selvagens e/ou de produção infectados podem, ocasionalmente, ser infectados por *B. abortus* ou *B. suis* (MOR *et al.*, 2016; MORTOLA, 2019). A infecção de origem alimentar também pode ocorrer, especialmente pelo consumo de leite cru e carne malcozida (MOR *et al.*, 2016; WARETH *et al.*, 2017). Embora hábitos de caça e consumo de carne crua ou malcozida tenham sido reportados em 61,3% (84/137) e 26,5% (39/147) dos cães amostrados, respectivamente, não foi constatada positividade para *B. abortus* ou *B. suis*. Esses resultados corroboram com os de outro estudo, conduzido em Fernando de Noronha, no qual também não houve soropositividade para cepas lisas nos animais avaliados (ALMEIDA *et al.*, 2022). Aparentemente, os cães amostrados, assim como seus tutores, têm pouco contato com animais de produção e, provavelmente, não ingeriram produtos de origem animal contaminados. Portanto, a infecção por *B. abortus* e *B. suis* é pouco provável.

Os exames laboratoriais são essenciais para o diagnóstico definitivo da brucelose devido à sintomatologia inespecífica desta doença (HULL & SCHUMAKER, 2018; SANTOS *et al.*, 2021). No caso de infecção por *Brucella* spp., o isolamento e a identificação do agente são considerados o padrão-ouro para o diagnóstico. No entanto, é um procedimento arriscado, considerando o potencial de transmissão para os funcionários de laboratório, além de produzir muitos resultados falso-negativos, devido à baixa sensibilidade do teste (SANTOS *et al.*, 2021). Muitos fatores contribuem para a baixa sensibilidade, incluindo a quantidade de bactérias na amostra; bacteremia intermitente; amostras de baixa qualidade; exigências de cultivo; multiplicação lenta; escolha incorreta do meio de cultivo; e uso de EDTA, em vez de heparina ou citrato de sódio como anticoagulante, o qual inibe o crescimento bacteriano (COSFORD, 2018; SANTOS *et al.*, 2021; DE MASSIS *et al.*, 2022). Por essas razões, testes sorológicos são geralmente usados na vigilância da brucelose humana e animal (HULL & SCHUMAKER, 2018). Os testes sorológicos disponíveis para detectar espécies lisas de *Brucella* não apresentam reação cruzada para espécies

rugosas de *Brucella*, exigindo testes específicos para cada tipo de amostra, os quais foram aplicados no presente estudo (HENSEL; NEGRON; ARENAS-GAMBOA, 2018).

A PCR não detectou o DNA de *Brucella* spp. no sangue dos indivíduos soropositivos. A não concordância entre os resultados dos testes sorológicos e moleculares pode ser explicada pela ausência de bacteremia durante a coleta de sangue. A bacteremia na infecção por *B. canis* é prolongada, mas intermitente, e habitualmente está ausente nas infecções crônicas, impossibilitando o isolamento do agente (FERNANDES *et al.*, 2013). A soroconversão, sem detecção de DNA bacteriano, pode ser explicada por uma resposta imune competente ao desafio, sendo mediada por linfócitos T *helper* 1 (COSFORD, 2018). Estudos indicam que *B. canis* invade as células do hospedeiro do modo mais eficiente do que as cepas lisas. Contudo, tem uma menor capacidade de sobrevivência no meio intracelular (CHACÓN-DÍAZ *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2021). Outra possibilidade é que os resultados sejam falso-positivos, devido a reações cruzadas com antígenos de superfície compartilhados com outros micro-organismos, particularmente bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*) (COSFORD, 2018; KAUFFMAN & PETERSEN, 2019; MOL *et al.*, 2020; DE MASSIS *et al.*, 2022).

2. Limitações do estudo

Devido a possibilidade de resultados falso-positivos (SANTOS *et al.*, 2021), a associação de testes sorológicos foi proposta neste trabalho com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados (DE MASSIS *et al.*, 2021). Tendo em vista o potencial de transmissão zoonótica e o risco de disseminação da doença na população canina, os resultados positivos não podem ser ignorados. Idealmente, uma investigação nas famílias dos cães soropositivos deveria ser realizada, incluindo a coleta de amostras biológicas em diferentes momentos para fins de diagnóstico.

3. Conclusões gerais

O presente estudo mostrou a ausência de soropositividade para *Brucella abortus* e *Brucella suis* em humanos e cães, além da ausência de soropositividade para *Brucella canis* em humanos e de baixa soropositividade em cães. No entanto, não se detectou o DNA bacteriano em nenhuma amostra de sangue pelo método de PCR. Todos os cães soropositivos residiam no litoral continental (município de Guaraqueçaba), porém não eram relacionados. A ausência de soropositividade nas ilhas e a baixa soropositividade no litoral continental pode ser reflexo do isolamento geográfico e sugere o baixo impacto da doença na região. Apesar da ausência de tutores sororreagentes, a presença de cães soropositivos indica a necessidade de medidas preventivas para evitar o risco de transmissão de *B.canis* tanto para outros cães como para humanos.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brucelose Humana**. Brasília. Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/b/brucelose-humana>>. Acesso em: 24 jan. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde**. Brasília. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agravos-e-eventos-de-saude-publica>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

CARMICHAEL, L. E.; BRUNER, D. W. Characteristics of a Newly-Recognized Species of *Brucella* Responsible for Infectious Canine Abortions. **The Cornell veterinarian**, v. 48, n. 4, p. 579–92, out. 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5693645>>.

CASALINUOVO, F.; CIAMBRONE, L.; CACIA, A.; RIPPA, P. Contamination of Bovine, Sheep and Goat Meat with *Brucella* Spp. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, p. 5913, 6 jun. 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5090120/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090120/)>. Acesso em: 16 fev. 2023.

CASTILLO, Y.; TACHIBANA, M.; KIMURA, Y.; KIM, S.; ICHIKAWA, Y.; ENDO, Y.; WATANABE, K.; SHIMIZU, T.; WATARAI, M. Microplate Agglutination Test for Canine Brucellosis Using Recombinant Antigen-Coated Beads. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–4, 29 out. 2014. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4897435/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264897435/)>. Acesso em: 11 abr. 2023.

CHACÓN-DÍAZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; GONZÁLEZ-ESPINOZA, G.; MEDINA, M. C.; ALFARO-ALARCÓN, A.; BOUZA-MORA, L.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; WONG, M.; BARQUERO-CALVO, E.; ROJAS, N.; GUZMÁN-VERRI, C.; MORENO, E.; CHAVES-OLARTE, E. *Brucella canis* Is an Intracellular Pathogen That Induces a Lower Proinflammatory Response than Smooth Zoonotic Counterparts. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p. 4861, 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4645416/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264645416/)>. Acesso em: 16 fev. 2023.

COLOMA-RIVERO, R. F.; FLORES-CONCHA, M.; MOLINA, R. E.; SOTO-SHARA, R.; CARTES, Á.; OÑATE, Á. A. *Brucella* and its hidden flagellar system. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 83, 31 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/1/83>>.

CORBEL, M. J.; WORLD HEALTH ORGANIZATION.; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.; INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS. **Brucellosis in Humans and Animals**. World Health Organization, 2006. 102 p.

COSFORD, K. L. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 74, 1 jan. 2018. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5731389/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35731389/)>. Acesso em: 16 fev. 2023.

DE MASSIS, F.; SACCHINI, F.; AVERAIMO, D.; GAROFOLO, G.; LECCHINI, P.; RUOCCO, L.; LOMOLINO, R.; SANTUCCI, U.; SGARIGLIA, E.; CROTTI,

- S.; PETRINI, A.; MIGLIORATI, G.; D'ALTERIO, N.; GAVAUDAN, S.; TITTARELLI, M. First Isolation of *Brucella canis* from a breeding kennel in Italy. **Veterinaria italiana**, v. 57, n. 3, p. 215–226, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34641664/>>. Acesso em: 3 abr. 2023.
- DE MASSIS, F.; SACCHINI, F.; PETRINI, A.; BELLUCCI, F.; PERILLI, M.; GAROFOLO, G.; SAVINI, G.; TITTARELLI, M. Canine brucellosis due to *Brucella canis*: description of the disease and control measures. **Veterinaria italiana**, v. 58, n. 1, p. 5–23, 18 nov. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35766163/>>. Acesso em: 23 fev. 2023.
- DE SOUZA CABRAL, F. G.; SAVALLI, C. Sobre a relação humano-cão. **Psicologia USP**, v. 31, 20 mar. 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/pusp/a/BJvpLMPJfmJSH6nLWYRVtft/?lang=pt>>. Acesso em: 29 jan. 2023.
- DELAI, R. R.; FREITAS, A. R.; KMETIUK, L. B.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; FERREIRA, I. B.; LESCOANO, S. A. Z.; GONZÁLES, W. H. R.; BRANDÃO, A. P. D.; DE BARROS-FILHO, I. R.; PETTAN-BREWER, C.; FIGUEIREDO, F. B.; DOS SANTOS, A. P.; PIMPÃO, C. T.; SANTARÉM, V. A.; BIONDO, A. W. One Health approach on human seroprevalence of anti-*Toxocara* antibodies, *Toxocara* spp. eggs in dogs and sand samples between seashore mainland and island areas of southern Brazil. **One Health**, v. 13, 1 dez. 2021.
- DIVE, D. de V. E. **Protocolo estadual de brucelose humana: manejo clínico e vigilância em saúde**. 2019, 38 p.
- EL-SAYED, A.; AWAD, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, 1 jan. 2018.
- FERNANDES, A. R. da F.; KIM, P. de C. P.; DANTAS, S. B. de A.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Detecção de DNA de *Brucella* spp. em amostras de sangue e de suabe vaginal ou prepucial de cães do município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Vet. Res. Anim. Sci**, n. 3, p. 206–210, 2013.
- FRANÇA, D. A. de. **Soropositividade de *Brucella* spp. e *Coxiella burnetii* em pacientes com suspeita de dengue no estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2021.
- FREITAS, A. R.; DELAI, R. R.; KMETIUK, L. B.; DA SILVA, E. C.; MARTINI, R.; BRANDÃO, A. P. D.; GIUFFRIDA, R.; DE BARROS-FILHO, I. R.; COSTA DA SILVA, R.; LANGONI, H.; FIGUEIREDO, F. B.; PIMPÃO, C. T.; DOS SANTOS, A. P.; SANTARÉM, V. A.; BIONDO, A. W. Seropositivity of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Owners and Their Dogs Living on Island and Mainland Seashore Areas of Southern Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 10, 1 out. 2022.

- GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Brucelose canina. *Em: Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 862–889.
- HENSEL, M. E.; NEGRON, M.; ARENAS-GAMBOA, A. M. Brucellosis in Dogs and Public Health Risk. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 8, p. 1401–1406, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30014831/>>. Acesso em: 23 fev. 2023.
- HÖRD, A.; LÓPEZ, M. G.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; SCHLEUNING, M.; WEINHOLD, L. M.; TINDALL, B. J.; GRONOW, S.; KYRPIDES, N. C.; WOYKE, T.; GÖKER, M. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 7 abr. 2020.
- HULL, N. C.; SCHUMAKER, B. A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. **Infection Ecology and Epidemiology**, Taylor and Francis Ltd., 1 jan. 2018.
- JAMES, D. R.; GOLOVSKY, G.; THORNTON, J. M.; GOODCHILD, L.; HAVLICEK, M.; MARTIN, P.; KROCKENBERGER, M. B.; MARRIOTT, D. J. E.; AHUJA, V.; MALIK, R.; MOR, S. M. Clinical management of *Brucella suis* infection in dogs and implications for public health. **Australian Veterinary Journal**, v. 95, n. 1–2, p. 19–25, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/avj.12550>>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- KAUFFMAN, L. K.; PETERSEN, C. A. Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 49, n. 4, p. 763–779, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30961996/>>. Acesso em: 23 fev. 2023.
- KEID, L. B.; DINIZ, J. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M. Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 6, p. 939–944, 1 dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26489371/>>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. **The Veterinary record**, v. 167, n. 3, p. 96–99, 17 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20643887/>>. Acesso em: 27 fev. 2023.
- KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS, S. A.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, p. 951–965,

16 nov. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s11259-006-0109-6>>.

KHOSHNOOD, S.; PAKZAD, R.; KOUPAEI, M.; SHIRANI, M.; ARAGHI, A.; IRANI, G. M.; MORADI, M.; PAKZAD, I.; SADEGHIFARD, N.; HEIDARY, M. Prevalence, diagnosis, and manifestations of brucellosis: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 22 dez. 2022. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC9813401/](https://pmc/articles/PMC9813401/)>. Acesso em: 10 abr. 2023.

KIMURA, M.; IMAOKA, K.; SUZUKI, M.; KAMIYAMA, T.; YAMADA, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. **The Journal of veterinary medical science**, v. 70, n. 7, p. 707–709, jul. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18685243/>>. Acesso em: 11 abr. 2023.

LAWINSKY, M. L. de J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. da R.; FARIA, N. do C.; CAVALCANTE, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 75–84, dez. 2010.

LIMA, M. de C. F.; MITTESTAINER, J. C.; ROCHA, P. B.; CARVALHO, E. R.; VEROSSI, B. do P.; PELLICCIARI, P. R.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Principais zoonoses em pequenos animais: breve revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 1, p. 84–106, 24 jan. 2022. Disponível em: <<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/708>>.

LIU, D. *Brucella*. Em: **Molecular Medical Microbiology**. Elsevier, 2015. p. 1781–1788.

LYTRAS, T.; DANIS, K.; DOUNIAS, G. Incidence Patterns and Occupational Risk Factors of Human Brucellosis in Greece, 2004–2015. **The International Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 221, 1 out. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6817955/](https://pmc/articles/PMC6817955/)>. Acesso em: 19 fev. 2023.

MANGALGI, S. S.; SAJJAN, A. G.; MOHITE, S. T.; GAJUL, S. Brucellosis in Occupationally Exposed Groups. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 4, p. DC24, 1 abr. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4866102/](https://pmc/articles/PMC4866102/)>. Acesso em: 16 fev. 2023.

MAURELIO, A. P. V.; BIANCA PAOLA, S.; FERREIRA, D. O. L.; MARTINS, M. T. A.; PAES, A. C.; JANE MEGID. Situação epidemiológica mundial da brucelose humana. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 4, p. 547–560, 2016.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A. Brucelose. Em: **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 21–55.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A.; SAMARTINO, L. E. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1575–1579, 3 set. 2012. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-012-0108-2>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

MIA, M. M.; HASAN, M.; PORY, F. S. Occupational exposure to livestock and risk of tuberculosis and brucellosis: A systematic review and meta-analysis. **One Health**, v. 15, p. 100432, 1 dez. 2022. Acesso em: 16 fev. 2023.

MINHARRO, S.; CLAUDIA, A.; COTTORELLO, P.; MIRANDA, K. L.; PAULA, A.; STYNEN, R.; ALVES, T. M.; PEREIRA LAGE, A. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.167-173, jul./dez. 2005. Disponível em: <www.cbra.org.br>.

MOL, J. P. S.; GUEDES, A. C. B.; ECKSTEIN, C.; QUINTAL, A. P. N.; SOUZA, T. D.; MATHIAS, L. A.; HADDAD, J. P. A.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 1, p. 77–86, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31752635/>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

MOR, S. M.; WIETHOELTER, A. K.; LEE, A.; MOLONEY, B.; JAMES, D. R.; MALIK, R. Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: clinical findings and implications for zoonotic transmission. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, 9 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27613248/>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

MORTOLA, E. *Brucella Abortus* in Dog Population: An Underestimated Zoonotic Disease. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 15, n. 2, 27 fev. 2019. Disponível em: <<https://biomedres.us/fulltexts/BJSTR.MS.ID.002681.php>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

PAL, M.; GIZAW, F.; FEKADU, G.; ALEMAYEHU, G.; KANDI, V. Public Health and Economic Importance of Bovine Brucellosis: An Overview. **American Journal of Epidemiology and Infectious Disease**, Vol. 5, 2017, Pages 27-34, v. 5, n. 2, p. 27–34, 14 jun. 2017. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ajeid/5/2/2/index.html>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

PEREIRA, C. R.; DE ALMEIDA, J. V. F. C.; DE OLIVEIRA, I. R. C.; DE OLIVEIRA, L. F.; PEREIRA, L. J.; ZANGERÔNIMO, M. G.; LAGE, A. P.; DORNELES, E. M. S. Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–19, 1 maio 2020. Disponível em: <pmc/articles/PMC7252629/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose-uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, Vol. 10, N. 2, 2003.

QUINN, P. J.; MARKEY B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 166–171 p.

RAMAMOORTHY, S.; WOLDEMESKEL, M.; LIGETT, A.; SNIDER, R.; COBB, R.; RAJEEV, S. *Brucella suis* Infection in Dogs, Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2386, 2011. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3311166/](https://doi.org/10.1186/1528-7575-17-12-2386)>. Acesso em: 11 abr. 2023.

RODRIGUES, R. T. G. A.; BEZERRA, J. A. B.; MEDEIROS, V. B.; FILGUEIRA, K. D. Brucelose canina: uma revisão prática para o clínico veterinário de pequenos animais. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, p. 216–232, 2017.

SANTOS, R. L.; SOUZA, T. D.; MOL, J. P. S.; ECKSTEIN, C.; PAÍXÃO, T. A. Canine Brucellosis: An Update. **Frontiers in Veterinary Science**, Frontiers Media S.A., 2 mar. 2021.

SHANSON, D. C. Zoonoses. *Em: Microbiology in Clinical Practice*. Butterworth-Heinemann, 1989. p. 507–532.

SOUSA, M. G. S.; SALVARANI, F. M.; BOMJARDIM, H. A.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D. Brucellosis in water buffaloes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 234–240, 1 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/pvb/a/Bmb6WG3fk64ZkDyDssQ6M8t/?lang=en>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SUZUKI, E. Y.; PENHA, G. de A.; UEDA, F. dos S.; SALVARANI, R. de S.; ALVES, M. L.; ZAPPA, V. Brucelose canina: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 10, 2008. Disponível em: <www.revista.inf.br-www.editorafaef.com.br-www.faef.br>.

TULU, D. Bovine Brucellosis: Epidemiology, Public Health Implications, and Status of Brucellosis in Ethiopia. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. Volume 13, p. 21–30, jan. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dvmr20>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

TUON, F. F.; CERCHIARI, N.; CEQUINEL, J. C.; DROPPA, E. E. H.; MOREIRA, S. D. R.; COSTA, T. P.; NAVARRO, A. de P. B.; HANDAR, A. M.; SOUZA, M. N. de; BRUCELLOSIS WORKGROUP. Guidelines for the management of human brucellosis in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 458–464, 1 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28954065>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

WALLACH, J. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; BALDI, P. C.; FOSSATI, C. A. Human Infection with M- Strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 146, 2004. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3322762/](https://doi.org/10.1186/1528-7575-10-1-146)>. Acesso em: 27 fev. 2023.

WALLACH, O. **Timeline: The Domestication of Animals**. Disponível em: <<https://www.visualcapitalist.com/the-domestication-of-animals/>>. Acesso em: 31 dez. 2022.

WARETH, G.; MELZER, F.; EL-DIASTY, M.; SCHMOOCK, G.; ELBAUOMY, E.; ABDEL-HAMID, N.; SAYOUR, A.; NEUBAUER, H. Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. e27–e30, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12535>>.

XAVIER, M. N.; COSTA, É. A.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2252–2260, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/X8hTxjBwfrBJWVCGPVFDGD/?lang=en>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

YÜKSEKKAYA, Ş.; ARAS, Z.; UÇAN, U. S. Investigation of *Brucella canis* seroprevalence in brucellosis suspected cases. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 47, n. 1, p. 152–157, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23390913/>>. Acesso em: 27 fev. 2023.