

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella canis* EM CÃES: OCORRÊNCIA EM AMOSTRAS RECEBIDAS PELO LABMOL-VET/UFPEL

ESTEFANI RINALDI¹; GUSTAVO CARDOSO FERREIRA KLAN²; BIBIANA RODRIGUES DE FREITAS³; WILLIAN CARDOSO FERREIRA ZORRER⁴; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁵; LUÍZ FILIPE DAMÉ SCHUCH⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – estefanirinaldi@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – guklann@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – freitasbibiana95@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – willian.cardoso@ufpel.edu.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas – lfdschuch@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Brucella* é constituído por bactérias Gram negativas, intracelulares facultativas e aeróbicas, causando infecções prolongadas em diversos mamíferos (YAN et al., 2022). Esses patógenos representam um dos maiores desafios para o controle em políticas de saúde pública e agrícola, sendo reportados mundialmente (GUERRA, 2007). A brucelose canina é causada principalmente por *Brucella canis*, uma espécie rugosa e que não apresenta expressão da cadeia O em seu lipopolissacarídeo (LPS). A brucelose canina é uma zoonose negligenciada e subdiagnosticada no Brasil, apesar de sua importância, sendo considerada uma doença infecciosa crônica (OLSEN; PALMER, 2014).

A transmissão deste microrganismo ocorre principalmente pelo contato direto dos animais suscetíveis com secreções e fluidos de animais infectados. A maioria dos casos das infecções em cães é adquirida por via venérea (inclusive por inseminação artificial), pelo contato com fetos e membranas fetais após abortos ou natimortos, ou ainda por transmissão vertical da mãe para o feto. No entanto, a transmissão também pode ocorrer apenas pelo contato próximo entre cães. Os sinais clínicos são variados, incluindo infertilidade, abortos espontâneos em fêmeas, epididimite e orquite em machos, além de morte neonatal, filhotes fracos, linfadenopatia, letargia, dentre outros (DE MASSIS et al., 2021). Embora cães castrados não apresentem sinais reprodutivos, ocasionalmente desenvolvem outras condições, como doenças oculares e disco espondilite (ROVID, 2018).

O controle de *B. canis* é complexo devido à presença de portadores assintomáticos, dificuldades no diagnóstico, ineficácia dos tratamentos antibióticos e a escassez de informações sobre a sobrevivência e a remoção do patógeno do ambiente (SANTOS et al., 2021). Embora a transmissão para humanos por *B. canis* seja rara, a infecção pode causar sintomas como febre, fadiga, e dores articulares e musculares (OLSEN; PALMER, 2014).

O diagnóstico em cães baseia-se em métodos sorológicos como Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaio Imuno enzimático em pontos (dot-ELISA). No entanto, o diagnóstico sorológico da brucelose canina continua sendo um desafio devido à sensibilidade variada dos testes disponíveis e, quando utilizados em associação, resultam em baixa concordância (MOL et al., 2020). Nos últimos anos, métodos moleculares de diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido cada vez mais empregados. Embora a PCR apresente alta especificidade, sua sensibilidade pode variar devido à bacteremia intermitente em cães infectados por *B. canis*; ainda assim, é uma técnica que permite detectar o agente com precisão (MOL et al., 2020).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de *Brucella canis* e coinfecção com outros agentes infecciosos em amostras clínicas de cães, utilizando o método de diagnóstico PCR.

2. METODOLOGIA

A pesquisa empregou o método de PCR com amostras do banco genético do LaBMol-Vet, de cães que passaram por exame diagnóstico para outros agentes como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Anaplasma platys*, *Leptospira interrogans*, cinomose (Canine Distemper Virus) ou para a própria *Brucella canis* na rotina de diagnósticos do laboratório. As amostras foram enviadas ao LaBMol-Vet por veterinários de clínicas públicas e privadas da região, de cães apresentando sinais clínicos inespecíficos característicos de enfermidades infecciosas, provenientes de cães de Pelotas, Capão do Leão e outros municípios desta região no estado do Rio Grande do Sul.

O DNA foi extraído de amostras de sangue, urina e tecido, utilizando o reagente QuickZol™ (Trizol, Ludwig Biotec, Brasil), conforme protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado e verificado por espectrofotometria (260/280 e 260/230). As amostras extraídas foram armazenadas a -20°C.

A reação foi baseada no método descrito por YE et. al. (2022), desenhada para amplificar um fragmento do gene RM6/66. Foram utilizados três primers: BSU (5'-GCAGGTCGTTACCGTCGATC-3') e BCD (5'-CAATATCCGCAACGCCTCTTG-3'), que geram um amplicon de 310 pb e caracterizam a detecção de *Brucella canis* e BSD (5'-CATCAAGCCGCATCGCAGC-3') que gera um amplicon de 413 pb e caracteriza *Brucella* spp.

A reação de PCR foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 2,5 µl de tampão 10×, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de dNTPs (2,5 mM; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 0,5 µl de cada primer (10 pmol), 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil), 1 µl de DNA amostral (50 ng/µl) e água ultrapura, completando o volume final de 25 µl. Como controle negativo, foi utilizado 1 µl de água ultrapura, e como controle positivo, 1 µl de DNA extraído da vacina BOVILIS® RB-51 (MSD Saúde Animal). As condições de termociclagem foram as seguintes: pré-desnaturação a 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 61 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguidos por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação por PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o Ladder 50 bp (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, RS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram avaliadas 40 amostras, sendo seu material genético extraído de 36 de sangue, 3 de urina, 1 de sangue e urina, e 1 de tecido de testículo. O agente *Brucella canis* foi detectado por PCR em 2 (5,0%) das 40 amostras analisadas, enquanto em 38 (95,0%) não foi detectado. As duas amostras positivas eram de sangue, provenientes de um macho (Amostra 1) e uma fêmea (Amostra 2), sendo que ambos os animais apresentavam coinfecção (Tabela 1).

Tabela 1. Coinfecções e sinais clínicos dos cães positivos para *Brucella canis*

Positivos					
<i>Brucella canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Babesia</i> sp.	Sinais clínicos apresentados	

Amostra 1	+	+	-	Anemia; trombocitopenia
Amostra 2	-	+	(NR*)	Piometra, anemia

*Diagnóstico molecular não requisitado (NR)

O animal da Amostra 1 tinha 10 anos, era sem raça definida (SRD), castrado e apresentava anemia e trombocitopenia. Já o animal da Amostra 2 (SRD) possuía histórico clínico de piometra e suspeita de aborto prévio, com um quadro de anemia regenerativa. A positividade para *Brucella canis* nesses casos pode indicar uma circulação silenciosa do agente na população canina, possivelmente associada à ausência de sinais clínicos específicos ou à baixa suspeita dos médicos veterinários em incluí-la como diagnóstico diferencial. Essa hipótese torna-se ainda mais relevante no caso da fêmea com suspeita de aborto prévio, uma vez que o histórico reprodutivo poderia ter levantado a suspeita para brucelose canina. As amostras foram encaminhadas para diagnóstico molecular, por PCR convencional, para os hemoparasitas citados na Tabela 1.

Cães com brucelose podem se recuperar espontaneamente da infecção a partir de um ano após a infecção, embora a recuperação seja mais comum entre dois e três anos, e alguns animais permanecem cronicamente infectados por vários anos. (ROVID, 2018). Em relatos de caso, infecções em humanos por *B. canis* ocorreram após contato próximo com cães, especialmente aqueles que abortaram ou pariram recentemente, ou após exposição a grandes quantidades do agente em laboratórios. (ROVID, 2018).

Esses resultados sugerem que a *B. canis*, deve ser incluída como diagnóstico diferencial de enfermidades nos cães da região e aponta a necessidade de atenção em seres humanos, indicando o risco de infecções com animais de companhia (DENTINGER, 2014).

4. CONCLUSÕES

A detecção de animais infectados ressalta a importância de estudos mais detalhados na região e a importância de o veterinário clínico considerar *Brucella canis* como diagnóstico diferencial em doenças infecciosas, podemos demonstrar a utilidade e a praticidade do diagnóstico molecular para *B. canis* implantado na rotina de diagnóstico para cães. A inovação do estudo foi a utilização de técnicas de biologia molecular no diagnóstico, contribuindo para melhorar a identificação e o monitoramento da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 2021.

DENTINGER, C.M.; JACOB, K.; LEE, L.V.; MENDEZ, H.A.; CHOTIKANATIS, K.; MCDONOUGH, P.L.; CHICO, D.M.; DE, B.K.; TILLER, R.V.; TRAXLER, R.M. Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy. **Zoonoses Public Health**, 62, 407–414, 2014.

GUERRA, H. The brucellae and their success as pathogens. **Critical reviews in microbiology** v. 33,4, 2007: 325-31. doi:10.1080/10408410701647644

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**, v. 32, n. 1, p. 77–86, 1 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638719891083>.

OLSEN, S. C.; PALMER, M. V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 6, p. 1076-1089, 2014. DOI: 10.1177/0300985814540545.

ROVID, A. **Brucellosis: Canine (*Brucella canis*)**. Iowa State University, College of Veterinary Medicine, Ames. Maio de 2018. Disponível em: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf.

SANTOS, R. L.; SOUZA, T. D.; MOL, J. P. S.; ECKSTEIN, C.; PAIXÃO, T. A. Canine brucellosis: an update. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 594291, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.594291.

SCHIAVO, L.; RIBEIRO, M. L.; ALMEIDA, M. B.; CUNHA, G. R.; ESPÍRITO SANTO, G. A. N.; MORIKAWA, V. M.; VICENTE, A. F.; PONSART, C.; SANTI, C. E.; KMETIUK, L. B.; MEGID, J.; BIONDO, A. W. One Health approach for *Brucella canis*: Serological and molecular detection in animal-hoarding individuals and their dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 18, n. 3, p. e0011974, 2024.

YAN, G.; PANG, Z.; HU, Y.; ZHOU, Z.; LIU, H.; LUO, Y.; REN, Z.; MA, X.; CAO, S.; SHEN, L.; et al. First isolation and multilocus sequence typing of *Brucella canis* from a subclinically infected pet dog in China. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 1, p. 22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9010022>.

YE, Y.B., YANG, J.H., LI, D.L., HAO, L.H., ZHANG, Z., MEI, S.Y., ZHANG, H., DU, F.Y., YV, L.H., LIU, B.S., CHEN, Z.L. A specific reverse complement sequence for distinguishing *Brucella canis* from other *Brucella* species. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 983482, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.983482.