JACQUELINE ASSUMPÇÃO DINIZ

**Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia
pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da
brucelose canina**

São Paulo

2018

JAQUELINE ASSUMPÇÃO DINIZ

**Desenvolvimento, padronização e validação de reação em
cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico
da brucelose canina**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada
às Zoonoses da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada
às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Lara Borges Keid

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3639
FMVZ

Diniz, Jaqueline Assumpção

Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da brucelose canina / Jaqueline Assumpção Diniz.
– 2018.

84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Lara Borges Keid.

1. *Brucella canis*. 2. Cães. 3. Hemocultura. 4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR). 5. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da brucelose canina", protocolada sob o CEUA nº 8401200717, sob a responsabilidade de **Lara Borges Keid e equipe; Jaqueline Assumpção Diniz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/12/2017.

We certify that the proposal "Development, standardization and validation of a real time polymerase chain reaction to the diagnosis of canine brucellosis", utilizing 100 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8401200717, under the responsibility of **Lara Borges Keid and team; Jaqueline Assumpção Diniz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/06/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2017** a **07/2018**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 120 meses**

N: **100**

Linhagem: **várias**

Peso: **1 a 60 kg**

Resumo: A brucelose é uma doença infecto-contagiosa de caráter zoonótico, acomete várias espécies de animais. Atualmente são conhecidas dez espécies de *Brucella* que são divididas em dois grupos (lisas e rugosas). A *Brucella canis* é uma das espécies que pertence ao grupo das brucelas rugosas. Essa espécie acomete cães, os quais podem apresentar problemas reprodutivos, gerando prejuízos econômico principalmente para os proprietários de canis, já que os animais podem facilmente ser infectados por via oral, inalação de aerossóis e pela via venérea. Vários métodos de diagnósticos foram desenvolvidos com o intuito de detectar infecções por *B. canis*, porém nem todos são eficientes. O cultivo microbiológico é o padrão ouro de diagnóstico, no entanto é um método oneroso, pode ocorrer contaminação com outros organismos, além de apresentar risco devido à manipulação de culturas de *Brucella*. Os testes sorológicos são bastante empregados, mas dependendo da fase da doença não são capazes de detectar a infecção, o que pode gerar resultados falsos-negativos. O método molecular utilizando PCR (reação em cadeia pela polimerase) convencional tem sido apontado como método de alta sensibilidade, sendo uma alternativa para o diagnóstico direto de brucelose nos cães. A PCR em tempo real, tende a apresentar maior sensibilidade e especificidade quando comparada à PCR convencional, além de maior rapidez na execução. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é desenvolver, padronizar e validar a PCR em tempo real para diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis* utilizando amostras de sangue total. As amostras utilizadas serão colhidas de cães pertencentes a canis comerciais, os quais passarão por anamnese e avaliação clínica para verificar a presença de problemas reprodutivos. No total, serão utilizados 100 cães. O sangue será submetido a hemocultura e a técnica de PCR em tempo real, posteriormente os resultados serão comparados por meio do coeficiente Kappa e teste de McNemar. O teste de Qui-quadrado irá determinar a associação da presença de sinais clínicos sugestivos de brucelose e a positividade nos testes de hemocultura e PCR em tempo real.

Local do experimento: As coletas das amostras serão realizadas no local de manutenção dos animais. Os procedimentos laboratoriais serão conduzidos nos Laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP, no campus de Pirassununga.

São Paulo, 02 de abril de 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Profa. Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DINIZ, Jaqueline Assumpção

Título: Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico de brucelose canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me manter em equilíbrio diante dos obstáculos.

Ao meus pais, Geosvaldo e Mafalda, e ao meu irmão Anderson, por todo amor incondicional, incentivo e suporte.

À Professora Dra. Lara Borges Keid pela orientação, paciência e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Rodrigo Martins Soares pela contribuição e ensinamentos.

Aos animais que foram utilizados, sem os quais não seria possível realizar o estudo.

À minha família pela torcida e boas vibrações.

Aos amigos que mesmo longe enviavam mensagens de incentivo, e aqueles que estavam por perto pelos bons momentos de convivência.

Aos colegas que conheci nesses dois anos, da FZEA/USP (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo) e da FMVZ/USP (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo), pelo bom relacionamento.

Aos funcionários da FZEA/USP e da FMVZ/USP por toda ajuda e eficiência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro, FAPESP (Nº Processo 2016/07913-0).

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram.

RESUMO

DINIZ, J. A. **Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da brucelose canina.** [Development, standardization and validation of a real time polymerase chain reaction for the diagnosis of canine brucellosis]. 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A *Brucella canis* é a espécie de *Brucella* que acomete os cães, acarretando problemas reprodutivos e prejuízos econômicos aos proprietários de canis comerciais, além do risco que representa para os manipuladores e os proprietários dos cães, os quais podem adquirir a infecção pelo contato com os animais infectados e/ou materiais contaminados por *B. canis*. Vários métodos de diagnósticos foram desenvolvidos com o intuito de diagnosticar a brucelose nos cães, no entanto cada teste apresenta um desempenho diferente em relação à sensibilidade, especificidade, rapidez e praticidade na identificação dos cães acometidos. Estudos indicam que a PCR em tempo real tende a apresentar maior sensibilidade e especificidade, além da rapidez na execução. Diante disso o objetivo deste trabalho foi desenvolver, padronizar e validar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da brucelose canina causada por *B. canis* utilizando amostras de sangue total de cães. Um total de 56 cães de canis comerciais e animais domiciliados, foram submetidos à hemocultura, sorodiagnóstico, PCR convencional (PCRc) e PCR em tempo real (PCRtr) e posteriormente os resultados obtidos em cada teste foram comparados por meio do coeficiente *Kappa*. Na padronização das reações de PCRtr foram testados três conjuntos de *primers* e sondas (PCRtr-A, B e C), utilizando-se diferentes temperaturas de *annealing* e concentrações de *primers*. A PCRtr-B teve melhor desempenho sob temperatura de *annealing* de 59° C, utilizando 900 nM de *primers* tendo detectado um maior número de cães positivos em relação à hemocultura e PCRc. Porém o teste não se apresentou confiável, uma vez que ocorreram reações inespecíficas em amostras provenientes de cães não infectados, sugerindo uma baixa especificidade do teste. Portanto, as técnicas de hemocultura e PCRc apresentaram melhor desempenho do que a PCRtr avaliada para o diagnóstico de *B. canis*.

Palavras-chave: *Brucella canis*. Cães. Hemocultura. Reação em cadeia pela polimerase (PCR). Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCRtr).

ABSTRACT

DINIZ, J. A. **Development, standardization and validation of a real time polymerase chain reaction for the diagnosis of canine.** [Desenvolvimento, padronização e validação de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para diagnóstico da brucelose canina.]. 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Brucella canis is the species that affects dogs, causing reproductive problems and economic losses mainly for the owners of commercial kennels, besides the risk that it represents for the manipulators and the owners of dogs that can acquire the infection by the contact with infected animals or contaminated materials. Several diagnostic methods have been developed for the diagnosis of the infection in dogs. However, the performance of the tests vary regarding sensitivity, specificity, speed and practicality for the identification of infected dogs. Studies indicated that the real-time PCR (rtPCR) might show higher sensitivity and specificity, as well as speed of execution. Therefore, the objective of this study was to develop, standardize and validate a rtPCR assay for the diagnosis of canine brucellosis caused by *B. canis* using whole blood samples from dogs. A total of 56 dogs from commercial kennels and domiciled animals were tested through blood culturing, serological test, conventional PCR (cPCR) and rtPCR, and subsequently the results obtained in each test were compared using the Kappa coefficient. During the standardization of the rtPCR, three sets of primers and probes (rtPCR-A, B and C) were tested using different annealing temperatures and primer concentrations. rtPCR-B showed better performance under the annealing temperature of 59° C and using 900 nM of primers having detected a higher number of positive dogs when compared to blood culturing and PCRc. However, the test was considered not reliable to be used in canine brucellosis diagnosis, since non-specific reactions occurred in samples from uninfected dogs, suggesting a low specificity of the test. Therefore, the blood culturing and cPCR techniques showed a better performance than the developed rtPCR assay to be used in the diagnosis of *B. canis* infection in dogs.

Keywords: *Brucella canis*. Dogs. Blood culture. Polymerase chain reaction (PCR). Real time polymerase chain reaction (rtPCR).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- valor do <i>crossing point</i> (Cp) das triplicatas equivalentes a cada uma das diluições de DNA de <i>B. canis</i> utilizadas para determinação das curvas padrões das reações, bem como as concentrações correspondentes e os respectivos valores de desvio-padrão.....	55
Tabela 2- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRc) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de <i>annealing</i> de 54°C e utilizando-se 900 nM de <i>primers</i> em 46 amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de <i>Brucella</i> spp.....	56
Tabela 3- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRc) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de <i>annealing</i> de 59°C e utilizando-se 900 nM de <i>primers</i> em 28 amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de <i>Brucella</i> spp.....	57
Tabela 4- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRc) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de <i>annealing</i> de 59°C e utilizando-se 200 nM de <i>primers</i> em oito amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de <i>Brucella</i> spp.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Ocorrência da brucelose canina no Brasil a partir de testes sorológicos.	23
Quadro 2– Ocorrência da brucelose canina no Brasil, evidenciada por métodos microbiológicos e moleculares de diagnóstico.	25
Quadro 3– Sensibilidade e especificidade da PCR convencional aplicada em diferentes amostras de cães para o diagnóstico de brucelose canina.	28
Quadro 4- Concentração de DNA de <i>Brucella canis</i> , cepa RM6/66 em dez diferentes suspensões contendo tampão TE e DNA de sangue canino.	41
Quadro 5- Sequências dos <i>primers</i> e sondas utilizados nos testes de PCR convencional e PCR em tempo real, direcionados à sequência de inserção <i>IS711</i> para o diagnóstico de infecção por <i>Brucella canis</i> em cães.	44
Quadro 6- Valores de eficiência, <i>slope</i> e limiar de detecção das reações de PCR em tempo real.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- sensibilidade analítica da reação de PCR convencional empregando os <i>primers</i> 517F22 e 755R24 utilizando diferentes concentrações de DNA de <i>B. canis</i> (cepa RM6/66).....	49
Figura 2- sensibilidade analítica da reação de <i>Nested-PCR</i> empregando os <i>primers</i> 517F22 e 755R24 utilizando diferentes concentrações de DNA de <i>B. canis</i> (cepa RM6/66).....	50
Figura 3- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-A) à temperatura de <i>annealing</i> de 54° C, com 900 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D11.	51
Figura 4- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de <i>annealing</i> de 54° C, com 900 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D11.	52
Figura 5- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-A) à temperatura de <i>annealing</i> de 59° C, com 900 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D10.	52
Figura 6- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de <i>annealing</i> de 59° C, com 900 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D9.	53
Figura 7- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-C) à temperatura de <i>annealing</i> de 59° C, com 900 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D10.	53
Figura 8- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de <i>annealing</i> de 59° C, com 200 nM de <i>primers</i> e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de <i>Brucella canis</i> D4 a D11.	54
Figura 9 - reação de <i>Nested-PCR</i> empregando os <i>primers</i> 517F22 e 755R24, direcionados à sequência de inserção <i>IS711</i> para detecção de <i>Brucella</i> spp. em amostras de DNA obtidos de sangue canino.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Etiologia.....	17
2.2	Patogenia, sinais clínicos	19
2.3	Importância	21
2.4	Epidemiologia.....	23
2.5	Diagnóstico.....	25
3	JUSTIFICATIVA.....	34
4	OBJETIVOS	36
4.1	GERAL	36
4.2	ESPECÍFICO	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	ANIMAIS E AMOSTRAS	37
5.2	ANÁLISES LABORATORIAS.....	39
5.2.1.	Cepas Bacterianas Utilizadas	39
5.2.2.	Extração de ácidos nucleicos da cepa de <i>Brucella canis</i>	39
5.2.3.	Preparo das suspensões contendo diferentes concentrações de DNA de <i>Brucella canis</i>	40
5.2.4.	Determinação da sensibilidade analítica da PCR convencional	41
5.2.5	Determinação da sensibilidade analítica da <i>nested</i> -PCR.....	42
5.2.6	Eletroforese em gel de agarose	42
5.2.7.	Desenho de <i>primers</i> para PCR em tempo real para detecção de <i>Brucella spp</i>	43
5.2.8.	Padronização das reações de PCR em tempo real e determinação da sensibilidade analítica da reação ...	45
5.2.9.	Aplicação das reações de PCR convencional, PCR em tempo real e <i>nested</i> -PCR para a detecção de <i>Brucella spp</i> em amostras de sangue canino.	45

5.2.10. Alteração das condições de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) na tentativa de aumentar a especificidade de reação	46
5.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
5.3.1. Análise da eficiência das reações de PCR em tempo real.....	47
5.3.2. Análise da concordância entre os resultados obtidos nos diferentes testes diagnósticos aplicados às amostras caninas.....	48
6 RESULTADOS.....	49
6.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS REAÇÕES DE PCR CONVENCIONAL E NESTED-PCR.....	49
6.2 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL E APLICAÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO PARA DETECÇÃO DE <i>Brucella</i> spp. EM AMOSTRAS DE DNA OBITIDAS DE SANGUE CANINO	50
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade que atinge várias espécies de animais e inclusive o homem, é conhecida como uma doença que causa problemas de ordem reprodutiva, no entanto dependendo da espécie de hospedeiro acometida os sinais clínicos podem ser diversos. No Brasil, há uma preocupação maior com a brucelose nos bovinos/bubalinos e suínos, causadas, respectivamente, pela *Brucella abortus* e *Brucella suis*, que são infecções zoonóticas cuja a transmissão ao homem pode ocorrer principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados. Assim, foram criados no Brasil, programas sanitários pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) cujo objetivo é o controle e a erradicação da brucelose em animais de produção (MAPA, 2018).

A brucelose pode acometer também os cães, sendo neste caso, causada principalmente pela espécie *Brucella canis*. O potencial zoonótico desta espécie de *Brucella* já foi comprovado, porém sua relevância ainda é pouco conhecida (GREENE; CARMICHAEL, 2011).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2016), o Brasil apresenta a segunda maior população mundial de cães. Em pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), em 2013, concluiu-se que 44% das residências brasileiras apresentavam pelo menos um cão. Dados do IBGE indicam que o número de cães já é maior do que o número de crianças, pois em 2013 havia 45 milhões de crianças para 52 milhões de cães e a projeção para 2020 é de 41 milhões de crianças para 71 milhões de cães (RITTO; ALVARENGA, 2015; BRAGA, 2017; IBGE, 2015).

Os cães atualmente são comumente considerados membros da família e apresentam uma convivência muito próxima aos seus proprietários. A procura por cães de companhia vem estimulando a criação de cães com finalidade comercial. Segundo dados disponibilizados pela *Fédération Cynologique Internationale* (FCI, 2018), o número de cães provenientes de canis comerciais que foram registrados no Brasil, através da Confederação Brasileira de Cinofilia em 2017 foi estimado em 148.946 cães (CBKC, 2018).

Canis comerciais, muitas vezes, são deficientes em relação aos aspectos sanitários dos animais comercializados, podendo levar ao comércio de cães acometidos por zoonoses, entre elas a brucelose (KEID et al., 2017).

Nos cães, a brucelose é uma infecção de caráter crônico e persistente, responsável por problemas reprodutivos, sendo uma enfermidade de difícil tratamento. Não há vacina para a prevenção da brucelose nos cães e assim, a identificação dos animais acometidos por meio de testes laboratoriais de diagnóstico é a principal ferramenta para o controle dessa enfermidade e redução dos seus impactos (GREENE; CARMICHAEL, 2011).

Há vários métodos de diagnóstico disponíveis para a brucelose nos cães, baseados tanto em testes sorológicos quanto em métodos microbiológicos e moleculares, com desempenho variável em sensibilidade, especificidade, rapidez e praticidade na identificação de cães acometidos (KEID et al., 2007a,b,c; KEID et al., 2009; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015; LIMA, 2018).

Testes sorológicos, apesar de serem considerados rápidos e de simples realização, podem gerar resultados falso-positivos (GREENE; CARMICHAEL, 2011) e falso-negativos (KEID et al., 2009; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015), dificultando a confirmação do diagnóstico e a adoção de medidas de controle.

O diagnóstico definitivo é baseado no cultivo microbiológico, realizado principalmente em amostras de sangue canino (GREENE; CARMICHAEL, 2011). Porém, além de ser um método demorado, ainda depende da manipulação laboratorial de *Brucella*, acarretando riscos de transmissão aos laboratoristas (WALLACH et al., 2004).

Os testes moleculares de diagnóstico, baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), se mostraram uma alternativa ao diagnóstico microbiológico, porque permitem a identificação mais rápida dos cães acometidos e com maior segurança laboratorial e maior sensibilidade (KEID et al., 2007a, b,c; BATINGA et al., 2018, *in press*; LIMA, 2018). Contudo, o teste é baseado em várias etapas de processamento laboratorial, sendo trabalhoso para ser utilizado em larga escala.

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCRtr) vem sendo utilizada como uma alternativa à PCR convencional (PCRC), por apresentar, em geral, maior sensibilidade em relação à PCR convencional e por ser de realização menos laboriosa (INNIS; GELFAND, 1990; HEID et al., 1996), podendo ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da brucelose canina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa crônica, de distribuição mundial causada por bactérias Gram-negativas, na forma de coccobacilos, intracelulares facultativas, não formadoras de endosporos, pertencentes à família Brucellaceae e gênero *Brucella* (JONES, 1968; CARMICHAEL; BRUNNER, 1968; ALTON et al., 1976; CORBEL; BANAI, 2005).

O gênero é composto por diversas espécies, sendo que cada uma possui predileção por um hospedeiro animal e algumas delas apresentam potencial zoonótico. As espécies descritas no gênero *Brucella* até o momento e seus respectivos hospedeiros preferenciais são: *B. melitensis* (HUGHES, 1893) composta pelos biovars 1, 2 e 3, acomete caprinos e ovinos; *B. abortus* (SCHMIDT; WEIS, 1901; MEYER; SHAW, 1920) formada por biovars 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, responsável pela brucelose bovina e bubalina; *B. ovis* (BUDDLE, 1956), principal causa de epididimite nos ovinos, não é patogênica para os humanos; *B. canis* (CARMICHAEL; BRUNER, 1968) responsável pela brucelose canina.

A espécie *B. suis* (HUDDLESON, 1929) possui os biovars 1, 2, 3, 4 e 5, sendo que os biovars 1 e 3 são os causadores da brucelose nos suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) e nos selvagens (*Sus scrofa scrofa*), o biovar 2 infecta suídeos selvagens e já foi descrito em infecções na lebre europeia (*Lepus capensis*). O biovar 4 acomete as renas e caribus (*Rangifer tarandus* e subespécies) e o biovar 5 foi isolado de roedores silvestres (TRAUM, 1914; CORBEL, 1997). A *Brucella neotomae* foi relatada em roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida* (STOENNER; LACKMAN, 1957), sendo recentemente associada a infecções humanas (VILLALOBOS-VINDAS et al., 2017). A espécie *B. ceti* foi isolada de cetáceos, a *B. pinnipedialis* identificada em pinípedes (FOSTER et al., 2007). Outra espécie denominada *Brucella microti* foi isolada do roedor *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008) e de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (SCHOLZ et al., 2009). *B. inopinata* relatada em roedores, anfíbios e humanos, sendo que o hospedeiro de manutenção desta espécie ainda não identificado (SCHOLZ et al., 2010; TILLER et al., 2010a,b;

EISENBERG et al., 2012; FISCHER et al., 2012). *B. papionis* foi identificada em babuínos (WHATMORE et al., 2014) e *B. vulpis* descrita em raposas vermelhas (SCHOLZ et al., 2016).

Cepas de *Brucella* também foram identificadas em diferentes espécies de anfíbios com diversos quadros patológicos e condições graves causando alta mortalidade (MÜHLDOERFER et al., 2016; SCHOLZ et al., 2016b). Isolados de *Brucella* foram ainda descritos em arraias do gênero *Taeniura lymma*, após alta taxa de mortalidade observada num zoológico da Alemanha (EISENBERG et al., 2017).

As bactérias do gênero *Brucella* são discriminadas em dois grupos, lisas e rugosas, por possuírem características antigênicas distintas. Essa classificação refere-se à constituição do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular da bactéria. O LPS do grupo das lisas é constituído de lipídeo A, núcleo oligossacarídeo e cadeia O; nas estirpes rugosas há apenas o lipídeo A e o núcleo oligossacarídeo (CORBEL, 1997). O LPS é um dos fatores determinantes na virulência da bactéria (CARDOSO et al., 2006). Das as cinco espécies de *Brucella* que são conhecidas como clássicas são classificadas em lisas a *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* e em rugosas a *B. ovis* e *B. canis* (CORBEL, 1997; CORBEL; BANAI, 2005).

A Organização Internacional de Saúde Animal (OIE, 2018) preconiza notificação obrigatória em animais acometidos por *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*, e em ovinos infectados por *B. ovis*. No Brasil não há relatos da infecção por *B. melitensis*, sendo que brucelose causada por *Brucella suis* em qualquer espécie animal e a *Brucella abortus* em bovinos e bubalinos são de notificação obrigatória, bem como a infecção por *Brucella ovis* em ovinos (POESTER et al., 2002; LAGE et al., 2006; BRAGA et al., 2013). Em relação a ocorrência da infecção em hospedeiros silvestres no Brasil, há poucos relatos devido à carência de informações. Infecção por *B. ceti* já foram descritas em cetáceos no país (ATTADEMO et al., 2018; SÁNCHEZ-SARMIENTO, 2018).

Programas sanitários instituídos pelo MAPA visam ao controle e erradicação da brucelose ovina, suína, bovina e bubalina, os quais são baseados em medidas como o diagnóstico, sacrifício sanitário de animais infectados e o controle de trânsito animal (LAGE et al., 2006; GOMES, 2009; MAPA, 2018). No Brasil, há vacina disponível somente para a *B. abortus* e de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) a vacinação

é obrigatória em fêmeas bovinas e bubalinas na faixa etária de três a oito meses (LAGE et al., 2006; MAPA 2018).

Em relação à infecção causada por *B. canis* em cães, não há obrigatoriedade da notificação no Brasil, sendo assim, acredita-se que o número de casos de brucelose canina seja superior aos descritos na literatura científica (VARGAS et al., 1996; KEID, 2004; KEID, 2007a,b,c; KEID, 2017).

O primeiro relato de brucelose canina ocorreu em 1966 em canis nos Estados Unidos da América (EUA), com isolamento de uma bactéria com características diversas das outras brucelas, mas bioquimicamente similar à *B. suis*, não produtora de H₂S, produtora de urease, redutora de nitratos, oxidase positiva e não fermentadora, a qual foi denominada *B. canis* (ALTON et al., 1976; CARMICHAEL, 1966; CARMICHAEL; BRUNNER, 1968; JONES et al., 1968).

2.2 PATOGENIA, SINAIS CLÍNICOS

Os cães adquirem a infecção preferencialmente por via oral e inalação de aerossóis e também pela via venérea. Após a entrada da bactéria no hospedeiro, esta é fagocitada por macrófagos e por ser um organismo intracelular facultativo multiplica-se e permanece no interior do mesmo, sendo transportada para os linfonodos regionais causando linfadenopatia periférica. Em seguida, a bactéria atinge a circulação sanguínea no interior de monócitos, caracterizando a fase de bacteremia e ocorre a disseminação para todo o organismo do hospedeiro. Ao término da fase de bacteremia, o micro-organismo pode permanecer em órgãos como fígado, baço, linfonodos e órgãos reprodutivos (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; LARSSON et al., 1984; WANKE, 2004; HOLLET, 2006; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015).

Na fase de bacteremia, a concentração de bactérias circulantes é da ordem de 10³ por mililitro de sangue (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; SPINK, 1970; CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1970; FLORES-CASTRO, SEGURA, 1976; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; SHIN, 1996) e essa fase pode iniciar entre uma a quatro semanas após a infecção com duração de seis a 64 meses (FLORES-CASTRO;

SEGURA, 1976; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978). Em alguns cães esse período pode ser intermitente (GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979).

Os principais sinais clínicos observados nos cães são abortamento e infertilidade, porém a infecção pode causar morte embrionária, reabsorção fetal, nascimento de filhotes fracos, retenção de placenta, corrimento vaginal e subfertilidade (GOMES, 1999; MAIA, 1999; MEGID, 2002; HOLLETT, 2006; KEID et al., 2007b, HOLST et al., 2012; KEID et al., 2017). Os fetos abortados podem apresentar broncopneumonia, miocardite, hemorragia focal, nefrite, linfadenite e hepatite (HILL et al., 1971; GYURANECZ et al., 2011; HOLST, 2012; HOFER, 2012). Os machos podem desenvolver orquite, prostatite, epididimite, infertilidade, atrofia testicular, anormalidades espermáticas, dermatite escrotal (MEGID, 2002; WANKE, 2004; HOLLETT, 2006; KEID et al., 2007a, HOLST et al., 2012; KEID et al., 2017).

Outras manifestações de ordem não reprodutiva podem ocorrer com uma frequência menor e incluem glomerulonefrite, osteomielite, uveíte, discoespondilite, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e meningoencefalite. A febre é um achado incomum (MYER, 1969; SERIKAWA et al., 1978; BERTHELOT; BASTUJ, 1996; MEGID, 2002; HOLLETT, 2006; GREENE; CARMICHAEL, 2011; HOLST et al., 2012).

Em cães não reprodutores a maioria das infecções é assintomática, podendo ocorrer apenas linfonodomegalia, que muitas vezes é discreta (MOORE, 1969; BARG; GODOY; PERES, 1977; LEWIS; ANDERSON, 1973; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; LARSSON, 1980; CARMICHAEL; GREENE, 1990; ARAS; UÇAN, 2010; KEID et al., 2017).

Além da *B. canis*, as espécies lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), da bactéria também podem causar infecção nos cães. A ocorrência destas infecções é esporádica acometendo animais que tenham contato com bovinos, caprinos e suínos infectados. A enfermidade pode acontecer por meio da ingestão de leite cru, de tecidos animais, restos de placentas, fetos abortados, dentre outros materiais de animais infectados (BAEK et al., 2003; WANKE, 2004; MEGID et al., 2007; RAMAMOORTHY et al., 2011).

2.3 IMPORTÂNCIA

A infecção por *B. canis* é particularmente relevante nas criações caninas. Uma vez instalada na criação, a infecção causar prejuízos econômicos nos canis devido aos problemas reprodutivos e a perda do patrimônio genético (PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; WANKE, 2004; HOLLET, 2006; ARAS; UÇAN, 2010; GYURANECZ et al., 2011; HOFER et al., 2012; HOLST, 2012; KEID et al., 2017). É importante ressaltar que os animais infectados por *B. canis* podem ser assintomáticos, não demonstrando quadros de debilidade orgânica, sendo a mortalidade incomum, com exceção dos fetos que nascem com algumas complicações e morrem dentro de poucas horas. Porém a morbidade é elevada, pois a transmissão pode acontecer facilmente entre cães mantidos confinados, acometendo um grande número de animais (HILL et al., 1971; WANKE, 2004; HOLLET, 2006; ARAS; UÇAN, 2010; GYURANECZ et al., 2011; GREENE; CARMICHAEL, 2012; HOFER, 2012; HOLST, 2012; KEID et al., 2017).

Cães acometidos por *B. canis* podem ser fonte de infecção para a população de animais saudáveis. Nas criações caninas, muitas vezes a preocupação em lucrar com a venda dos filhotes, aliada à falta de conhecimento da maioria dos proprietários sobre medidas de manejo adequadas, fazem com que os criadores introduzam cães em seus plantéis portadores da infecção, o que contribui para a rápida disseminação da enfermidade nos canis (KEID et al., 2017).

A ausência de medidas como quarentena e exames que comprovem a sanidade do animal introduzido e o empréstimo de reprodutores entre os criadores são fatores que contribuem para propagação da bactéria (MAKLOSKI, 2011; KEID et al., 2017). Além disso os animais são geralmente alojados em conjunto com outros cães sendo as medidas de higiene deficientes, o que favorece a transmissão da infecção. A falta de regulamentação para o controle da infecção nas criações pode gerar impacto na saúde pública, já que pode haver o comércio de cães infectados (KEID et al., 2017).

O tratamento dos cães infectados tem um alto custo, sobretudo quando vários animais são acometidos, além disso *B. canis* é um micro-organismo intracelular facultativo, que pode se alojar em órgãos linfoides, tecido prostático e tecido ósseo, locais que alguns antimicrobianos não atingem o nível adequado para agir e eliminar

a bactéria, sendo necessária a associação de dois ou mais antimicrobianos, em doses elevadas e durante períodos prolongados, os quais nem sempre são eficientes em eliminar a infecção. Além disso, exige acompanhamento veterinário dos animais tratados (GREENE; CARMICHAEL, 2011). Assim, em muitos casos, para eliminar a infecção dos cães, é preconizada a eutanásia dos animais infectados, como método mais eficaz de controle (HALL; MANION, 1970; TERAOKA et al., 1978; FLORESCASTRO; CARMICHAEL, 1981; JONES, EMERSON 1984; MATEU; MARTIN, 1995; KEID et al., 2004; WANKE, 2004; LUCERO et al., 2005b; HOLLET, 2006; WANKE et al., 2006; GLYNN; LYNN, 2008; LUCERO et al., 2010a,b; NOMURA et al., 2010; HOLST et al., 2012; MANIAS et al., 2013; MARZETTI et al., 2013; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015; KEID et al., 2017).

Adicional preocupação relacionada à brucelose canina é o seu caráter zoonótico. Os manipuladores e os proprietários dos cães podem adquirir a infecção pelo contato com os animais infectados e/ou material contaminado por *B. canis*, ou ainda através dos acidentes em laboratórios durante a manipulação de isolados de *B. canis* (WALLACH et al., 2004; AYALA; JACOB, 2005; LUCERO al., 2005a; LUCERO al., 2005b; LUCERO et al., 2010a; MARZETTI et al., 2013).

O diagnóstico da infecção por *B. canis* no homem é difícil, pelo fato de não haver teste sorológico disponível para a identificação de anticorpos, de maneira que há poucos dados disponíveis sobre a sua ocorrência na população humana. As informações a respeito da sua ocorrência são pontuais, disponibilizadas por meio de publicações científicas baseadas em casos relatados (WALLACH et al., 2004; AYALA; JACOB, 2005; LUCERO al., 2005a; LUCERO al., 2005b; LUCERO et al., 2010a; MARZETTI et al., 2013), sendo difícil mensurar a real frequência de transmissão e o impacto da infecção na população humana.

Os sinais clínicos descritos nos seres humanos podem variar de brandos a severos e os principais são: febre, intensa sudorese, cansaço, perda de peso, cefaleia, náuseas e linfadenomegalia. Nos casos mais graves, podem ocorrer endocardite, mialgia, meningite, artrite, osteomielite, hepatite, abscessos viscerais, dentre outros sinais (ROXO et al., 1990; YING; NGUYEN; JAHRE, 1999; LUCERO et al., 2005b; DENTINGER et al., 2012; WALLACH et al., 2004; AYALA; JACOB, 2005; LUCERO al., 2005a; LUCERO al., 2005b; LUCERO et al., 2010a; MARZETTI et al., 2013).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A transmissão de *B. canis* pode ocorrer através da via venérea e principalmente pelo contato oronasal com fluidos fetais, fetos, placenta, secreções vaginais, sangue, leite materno, urina e secreções seminais. A urina, as secreções vaginais e o sêmen possuem um papel relevante na transmissão de *B. canis*, uma vez que podem conter elevadas concentrações da bactéria, a qual pode ser eliminada de forma intermitente, durante dias, meses ou até anos após a infecção, o que colabora para o sucesso na transmissão via oronasal (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; MOORE; KAKUK, 1969; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; HOLLET, 2006; KEID et al., 2007a,b).

De acordo com dados do Brasil, baseados em levantamentos sorológicos pontuais, a frequência da ocorrência da enfermidade pode chegar até 89,58% (Quadro 1) dependendo do teste de diagnóstico utilizado, da região pesquisada e da população de cães examinada (VARGAS et al., 1996; ALVES et al., 2003; AZEVEDO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; KEID et al., 2004; AGUIAR et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006; MALEK DOS REIS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; FERREIRA, et al., 2007; KEID et al., 2007a,b,c; CARVALHO et al., 2000; DORNELES et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; DREER et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; MACHADO et al., 2013; SANTANA et al., 2013; KEID et al., 2015; PAZ et al., 2015).

Quadro 1– Ocorrência da brucelose canina no Brasil a partir de testes sorológicos.

(Continua)

Local	População Canina	Número de cães	Teste de diagnóstico	Frequência de positivos	Referência
Uruguaiana - RS	Canil comercial	11	IDGA	72,70%	VARGAS et al. (1996)
Belém – PA	Abrigos	236	IDGA	45,34%	Carvalho et al. (2000)
Patos – PB	Zona rural	274	IDGA	3,60%	Alves et al. (2003)
Santana do Parnaíba –SP	Campanha de vacinação anti-rábica	410	IDGA	9,51%	Azevedo et al. (2003)

(Conclusão)

Local	População Canina	Número de cães	Teste de diagnóstico	Frequência de positivos	Referência
Alfenas – MG	Campanha de vacinação anti-rábica	635	IDGA	14,20%	Almeida et al. (2004)
Estado de São Paulo	Canil comercial	171	IDGA	33,91%	Keid et al. (2004)
Monte Negro – RO	Rural e urbana	304	IDGA	0,30%	Aguiar et al. (2005)
Salvador – BA	Urbana	85	IDGA	5,88%	Cavalcanti et al. (2006)
Rio de Janeiro – RJ	Urbana	316	IDGA	2,53%	Ferreira et al. (2007)
Salvador – BA	Urbana	85	IDGA	5,88%	Malek dos Reis et al. (2008)
Campina Grande – PB	Campanha de vacinação anti-rábica	170	IDGA	2,35%	Vasconcellos et al. (2008)
Araguaína - TO	Campanha de vacinação anti-rábica	374	IDGA	44,53%	Dorneles et al. (2011)
Patos – PB	Hospital Veterinário	193	IDGA	3,11%	Fernandes et al. (2011)
Umuarama– PR	Abrigos	175	IDGA	2,85%	Dreer et al. (2013)
Londrina – PR	Hospital Veterinário	22	IDGA	4,54%	Machado et al. (2013)
Natal – RN	Clínica	416	IDGA	28,90%	Fernandes et al. (2013)
Araguaína – TO	Domiciliados	241	IDGA	54,77%	Santana et al. (2013)
Belém/Castanhal – PA	Urbana	156	IDGA	1,56%	Paz et al. (2015)

Fonte: (adaptado de BATINGA, 2017).

Legenda: IDGA: Imunodifusão em gel de ágar

A ocorrência de brucelose canina também vem sendo evidenciada no Brasil por métodos microbiológicos e moleculares (Quadro 2) em cães pertencentes à canis comerciais e animais domiciliados (KEID et al., 2004; SILVA et al., 2012; KEID et al., 2017).

Quadro 2– Ocorrência da brucelose canina no Brasil, evidenciada por métodos microbiológicos e moleculares de diagnóstico.

Local	População Canina	Número de cães	Teste de diagnóstico	Frequência de positivos	Referência
Estado de São Paulo	Canis comerciais	171	Hemocultura	14,30%	Keid et al. (2004)
Estado de São Paulo	Canis comerciais	753	Hemocultura	20,90%	Keid et al. (2017)
Cuiabá - MT	Domiciliados	327	PCR	24,10%	Silva et al., 2012.

Fonte: (DINIZ, 2018).

Legenda: PCR: reação em cadeia pela polimerase

2.5 DIAGNÓSTICO

O cultivo microbiológico é o método definitivo para o diagnóstico e o sangue é o material de eleição para o isolamento do agente, em decorrência do longo período de bacteremia (CARMICHAEL; GREENE, 1990; KEID et al., 2007c). Diversos materiais biológicos já foram utilizados para diagnóstico do agente por meio do cultivo bacteriológico, como sêmen (KEID et al., 2007a), urina (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979), secreções vaginais (KEID et al., 2007b) e tecidos (MOORE; KAKUK 1969; WANKE, 2004; HOLLETE, 2006; ARAS; UÇAN, 2010), porém a presença da bactéria nesses locais depende da fase da infecção e da coleta adequada da amostra, que deve ser realizada de maneira asséptica, sendo o material armazenado sob refrigeração. Além disso, o tratamento do animal com antimicrobianos previamente à obtenção das amostras pode dificultar o isolamento bacteriano (MINHARRO et al., 2005; HOLLETE, 2006, KEID et al., 2017). Assim, a não detecção do agente pelo cultivo microbiológico não necessariamente indica ausência de infecção, já que a sensibilidade do diagnóstico utilizando essas amostras pode ser variável (KEID et al., 2007a,b,c; KEID et al., 2017).

O cultivo microbiológico possui alta especificidade, mas exige incubação por período prolongando, uma vez que a bactéria apresenta crescimento lento em meios de cultivo, o que pode propiciar a contaminação por outros micro-organismos e ainda

representa um risco aos manipuladores (ALTON et al., 1976; GODOY et al., 1979; WALLACH et al., 2004).

Os testes sorológicos são também utilizados no diagnóstico da brucelose canina para a identificação de anticorpos específicos presentes nos soros sanguíneos dos animais infectados. Os principais testes são: soroaglutinação lenta (SAL) (ALTON et al., 1976), soroaglutinação rápida (SAR) (CARMICHAEL, 1974; BADAKHSH et al., 1982; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; GEORGE; CARMICHAEL, 1974), soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol (SAR-2ME) (BADAKHSH et al., 1982), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (MYERS et al., 1974), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (MATEO-DE-ANTONIO et al., 1993; BALDI et al., 1994; ARESE et al., 1999; CASSATARO et al., 2002; LUCERO et al., 2002; WANKE et al., 2002; BARROUIN-MELO et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2011; ESCOBAR et al., 2010) e ensaios imunocromatográficos (ICT) (KIM et al., 2007).

Os testes sorológicos que utilizam antígenos de superfície bacteriana são compostos por lipopolissacarídeo rugoso (LPS-R) e pelas proteínas de membrana externa da bactéria, sendo o LPS-R é o antígeno imunodominante. Estes antígenos podem ser compartilhados com outros gêneros bacterianos, como *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*, podendo levar a resultados falsos-positivo pela reação cruzada entre anticorpos não específicos presentes nos soros dos animais livres da infecção por *Brucella* com estes antígenos (PICKERILL, 1970; GEORGE; CARMICHAEL, 1974; BADAKHSH et al., 1982; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; JOUBERT; JONES 1989; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; KEID et al., 2009, WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015; KEID et al., 2017).

Os níveis de anticorpos permanecem altos na fase de bacteremia, porém ao término desse período tendem a diminuir, assim parte dos cães pode apresentar resultados negativos (ZOHA et al., 1982; HOLLET, 2006; KEID et al., 2007a,b,c; WANKE et al., 2012; MAKLOSKI, 2011; KEID et al., 2017) .

De acordo com um estudo realizado por Keid et al. (2009) em criações comerciais do Estado de São Paulo, dos cães positivos pela hemocultura e/ou PCR, apresentaram resultados negativos nos testes de SAR, SAR-2ME e IDGA, respectivamente, 19,04%, 57,14% e 30,15%.

Num estudo realizado com o objetivo de avaliar o desempenho de diversos testes sorológicos em 102 cães pertencentes a canis comerciais do Estado de São Paulo, considerados infectados com base em resultados positivos no diagnóstico microbiológico e molecular em amostras de sangue, 25%, 62,5%, 72,2% e 10,48%, apresentaram resultados negativos, respectivamente, para SAR, SAR-2ME, IDGA e ICT (KEID et al., 2015).

Cães na fase de bacteremia, por estarem com infecção sistêmica, exibem maior potencial de eliminação bacteriana por meio de secreções e excreções, sendo importantes na transmissão do agente (KEID et al., 2009; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015). Assim, a utilização de testes diretos aplicados em amostras de sangue é importante para auxiliar no diagnóstico da infecção e reduzir a transmissão.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) (MULLIS, 1990) é o método molecular utilizado como alternativa ao cultivo microbiológico, uma vez que apresenta maior sensibilidade devido ao fato de detectar quantidades de DNA reduzidas da bactéria, não depender da viabilidade do micro-organismo e não apresentar problemas de interposição com contaminantes. Outra vantagem apresentada é a alta especificidade, a qual é dependente dos *primers* empregados, além de ser considerado um método mais rápido do que o cultivo microbiológico e de não depender da manipulação de culturas de *Brucella* (ERLICH et al., 1991; BRICKER, 2002; YANG; ROTHAMAN, 2004; KEID et al., 2007a,b,c; KANG et al., 2014; KAUFFMAN et al., 2014).

Estudos revelaram que a sensibilidade da PCR convencional utilizando marcadores gênero e espécie-específicos foi similar ou superior ao isolamento microbiológico para o diagnóstico de infecção por *B. canis* utilizando diversas amostras biológicas caninas (Quadro 3).

Quadro 3– Sensibilidade e especificidade da PCR convencional aplicada em diferentes amostras de cães para o diagnóstico de brucelose canina.

Primers usados	Amostras	Cães infectados	Cães não infectados	Teste Padrão-ouro	Sensibilidade	Especificidade	Fonte
ITS	Swab vaginal	33	16	Isolamento de <i>B. canis</i>	67,3%	100%	Keid et al. (2007a)
ITS	Sangue	33	16	Isolamento de <i>B. canis</i>	100%	100%	Keid et al. (2007a)
ITS	Sêmen	15	11	Isolamento de <i>B. canis</i>	86,6%	100%	Keid et al. (2007b)
ITS	Sangue	15	11	Isolamento de <i>B. canis</i>	100%	100%	Keid et al. (2007b)
ITS	Sangue	64	50	Isolamento de <i>B. canis</i>	100%	100%	Keid et al. (2007c)
ITS	Linfonodo inguinal	4	44	Isolamento de <i>B. canis</i>	100%	100%	Aras; Uçan (2010)
Região BCAN B0548-0549 do cromossomo II de <i>Brucella canis</i>	Sangue	13	-	Hemocultura, SAR-2ME e EIC	61,53%	-	Kang et al. (2014)

Fonte: (DINIZ, 2018).

Legenda:

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

SAR-2ME: soroaglutinação com 2-mercaptoetanol

EIC: ensaio imunocromatográfico

ITS: região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*

A PCR em tempo real mostrou-se uma alternativa à PCR convencional para o diagnóstico de enfermidades infecciosas e os principais fatores que contribuem para o sucesso neste diagnóstico são: alta sensibilidade, alta especificidade e maior rapidez na execução. A resolução do sistema de detecção dos produtos amplificados na PCR em tempo real é considerada maior do que na PCR convencional, já que a primeira é baseada na emissão de fluorescência pelos produtos amplificados que são marcados com corantes intercalantes fluorescentes ou pelo uso de sondas marcadas com fluoróforos, a qual é detectada por um leitor de fluorescência. Já na PCR convencional, a verificação dos produtos amplificados é feita visualmente, pela

observação dos produtos amplificados em gel de agarose após a coloração com brometo de etídio, sob luz ultravioleta (DEBEAUMONT; FALCONNET; MAURIN, 2005; KATTAR et al., 2007; BOUNAADJA et al., 2009; SOHRABI et al., 2014; HÄNSEL et al., 2015; KHAMESIPOUR, 2015; KADEN et al., 2017; LINDAHL-RAJALA et al., 2017).

Esta diferença no procedimento de detecção dos produtos amplificados também contribui para que a PCR em tempo real seja um teste de realização mais rápido quando comparado à PCR convencional, já que não necessita da etapa de eletroforese em gel de agarose.

Com relação à especificidade diagnóstica, nos procedimentos de PCR em tempo real baseados na utilização de sondas marcadas, a especificidade diagnóstica tende a ser mais elevada, já que além dos *primers*, o uso de sondas específicas reduz os riscos de amplificações inespecíficas (NAVARRO et al., 2015).

A PCR em tempo real mostrou-se promissora para diagnóstico de infecções por *Brucella* em algumas espécies, porém, há escassez de estudos voltados à avaliação de seu desempenho para o diagnóstico da brucelose canina (HINIĆ et al., 2008; BOUNAADJA et al., 2009).

HINIĆ et al. (2008) desenvolveram um protocolo de diferenciação de algumas espécies de *Brucella* utilizando PCR em tempo real e o convencional, para isso foram empregados sete pares de *primers* e sondas direcionados ao gene *BMEI0466* de *B. melitensis*, *BruAb2_0168* de *B. abortus*, *BR0952* de *B. suis*, *BOV_A0504* de *B. ovis*, *BMEI0635–0636* de *B. canis*, *BMEI0986–0988* de *B. neotomae* e *IS711*, gene comum a todas as espécies. Foram utilizados isolados de *Brucella* das espécies correspondentes aos *primers* e 49 isolados de outras bactérias, as quais foram submetidas à PCR em tempo real e convencional. Os dois ensaios apresentaram elevada sensibilidade e especificidade, quando confrontados com o cultivo microbiológico e a PCR em tempo real revelou ser uma ferramenta útil na detecção e diferenciação de espécies de *Brucella* em amostras clínicas, com baixa carga bacteriana.

Em um trabalho realizado por Bounaadja et al. (2009), o desempenho da PCR convencional foi comparado com a PCR em tempo real, empregando *primers* e sondas direcionadas aos genes *IS711/IS6501* e *bcsp31*, para detecção de *Brucella* spp. As reações foram avaliadas quanto à sensibilidade analítica, utilizando DNA obtido das cepas de referência de *B. ovis* 63/290, *B. melitensis* 16 M, *B. abortus* 544

e *B. canis* RM6/66. Concluiu-se que a PCR em tempo real baseada no sistema *TaqMan* apresentou maior sensibilidade analítica quando comparada ao método molecular convencional.

Dentre os *primers* utilizados neste trabalho, aqueles direcionados à sequência de inserção 711 (*IS711*) de *Brucella* apresentaram maior sensibilidade analítica, fato que pode ser explicado pelo elevado número de cópias deste elemento presente no genoma dos organismos do gênero *Brucella* (variando de 6 a 38 cópias conforme a espécie de *Brucella*). O uso de *primers* direcionados a elementos repetidos no genoma pode resultar numa maior sensibilidade da PCR, seja convencional ou em tempo real.

A avaliação do desempenho da PCR em tempo real para detecção de *Brucella suis* em amostras de sangue e tecidos de javalis selvagens (*Sus scrofa*) na Suíça, indicou que o método molecular é uma ferramenta diagnóstica importante para a detecção de animais infectados sorologicamente negativos. Foram empregados *primers*/sonda desenhados para a sequência de inserção *IS711*. Dos 144 animais avaliados, 16 (11,1%) apresentaram resultado positivo na PCR em tempo real nas amostras de sangue, apesar de apresentarem resultados negativos para a infecção nos três testes sorológicos utilizados (teste do antígeno acidificado tamponado, ELISA competitivo e ELISA indireto). A PCR aplicada em amostras de tecidos de 53 animais, apresentou resultado positivo em 26%, enquanto que *B. suis* foi isolada em apenas 9,4% dos animais (HINIĆ et al., 2009).

Surucuoglu et al. (2009) demonstraram uma maior sensibilidade diagnóstica da PCR em tempo real utilizando *primers* e sonda direcionados ao DNA codificador do RNA ribossomal 16S de *Brucella* spp., para o diagnóstico de brucelose humana. Os valores de sensibilidade e especificidade do teste foram, respectivamente, 88% e 100% em relação ao teste padrão ouro baseado no isolamento bacteriano.

Sola et al. (2014) realizaram um estudo utilizando cartão FTA® Elute, que é utilizado na conservação do DNA do agente de interesse, em conjunto com a técnica de PCR em tempo real empregando *primers* e sondas direcionados ao gene *bp26* e à sequência de inserção *IS711* de *Brucella*, com o objetivo de diagnosticar brucelose em lesões e amostras de tecidos bovinos coletadas em abatedouro. Das 276 amostras avaliadas, 28,3% (78/276) apresentaram resultado positivo para *Brucella* spp. e 198/276 (71,7%) tiveram resultado negativo. O teste demonstrou ser um método auxiliar para a detecção de *Brucella* spp. por possuir algumas vantagens como

rapidez, segurança e acurácia durante sendo auxiliar no procedimento de inspeção sanitária em matadouros.

Wareth et al. (2014) compararam dois testes de diagnóstico: ELISA indireto e a PCR em tempo real para a detecção de DNA de *Brucella* spp., em 215 amostras de leite, sendo que 72 eram provenientes de leite bovino e 128 de bubalinos, no Egito. O teste molecular, baseado em *primers* e sonda direcionados à sequência de inserção (*IS711*) de *Brucella* possibilitou a detecção específica de *B. abortus* e *B. melitensis* em 17 amostras de leite, sendo 16 positivas para *B. melitensis* e uma para *B. abortus*, enquanto que pelo sorodiagnóstico, 34 animais foram positivos.

De acordo com Sohrabi et al. (2014), a PCR em tempo real baseada no sistema *TaqMan*, direcionada à amplificação de parte do gene *bcsp31* de *Brucella* spp. revelou ser uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico da brucelose humana. O estudo consistiu da aplicação do método molecular em 62 amostras de soros sanguíneos humanos, sendo que 37 amostras eram provenientes de pacientes com diagnóstico confirmado para brucelose através do isolamento da bactéria e 25 faziam parte do grupo controle. A sensibilidade e a especificidade da PCR em tempo real foi de 100% em relação ao teste microbiológico. Além disso, os 37 pacientes positivos para brucelose receberam tratamento com associação de 2 antibióticos (doxiciclina e rifampicina) e foram monitorados através do método molecular ao longo do tratamento. Foi observado que houve uma diminuição da relação número de cópias por mililitro de DNA da bactéria em pacientes infectados, demonstrando que a PCR em tempo real pode ser útil no monitoramento de indivíduos submetidos ao tratamento da infecção.

Em um estudo realizado por Hänsel et al. (2015), um teste de PCR em tempo real desenvolvido e padronizado com *primers* e sonda direcionados ao *locus* *BS1330_II0657* do cromossomo II de *B. suis*, foi aplicado em isolados de *B. suis*, em 25 micro-organismos de referência de *Brucella* spp. e em 30 bactérias de diferentes gêneros. O limite de detecção da reação foi de 12,5 fg/μl de DNA de *Brucella* e a especificidade analítica foi de 100%. De acordo com esse resultado, a aplicação do método molecular pode ser uma ferramenta de diagnóstico promissora para a detecção específica de *B. suis*.

Num trabalho realizado com o objetivo de detectar a presença de DNA de *Brucella* em amostras de linfonodos e sangue de 135 camelos no Irã, obtidas em abatedouro, a PCR em tempo real possibilitou a detecção de *Brucella* spp. em 18

amostras de sangue (13,33%) e em quatro amostras de linfonodos (2,97%). *B. abortus* foi detectada em três amostras de sangue (2,22%), *B. melitensis* foi observada em quatro amostras de linfonodos (2,97%). O método utilizado no diagnóstico foi a PCR em tempo real, empregando *primers* e sondas direcionados aos genes *BMEI10466* de *B. melitensis* e *Bru-Ab2_0168* de *B. abortus* (KHAMESIPOUR et al., 2015).

Gwida et al. (2016) empregaram testes sorológicos em conjunto com a PCR em tempo real na detecção da infecção em vacas provenientes de rebanho leiteiro com histórico de abortamento e vacinação (RB51). *Primers* e sondas direcionados aos genes *bcbp31* de *Brucella* spp., *alk B* de *B. abortus* e *BME I1162* de *B. melitensis* foram utilizados no método molecular para detecção de *Brucella* em 257 amostras de sangue. Das amostras testadas, 123 (47,9%) apresentaram resultados negativos tanto nos testes sorológicos quanto na PCR, 17 (6,6%) foram positivas em todos os testes. O método molecular identificou 120 amostras positivas para *Brucella*. A PCR em tempo real permitiu ainda a detecção de cepas vacinais e de campo de *Brucella abortus* em animais soropositivos e soronegativos, indicando que o teste pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica complementar na identificação de animais infectados em condições de foco.

Kaden et al. (2017) desenvolveram uma reação de PCR em tempo real espécie-específica para detecção de todos os biovars de *B. melitensis* com uso de *primers* e sonda desenhados para o gene *acetil-CoA acetiltransferase*. Foram utilizados 120 isolados da bactéria provenientes de amostras clínicas de humanos coletadas entre os anos de 1994 e 2016, seis isolados de *B. melitensis* de referência, 31 de *Brucella* spp. e 45 de diversas bactérias. O método apresentou 100% de especificidade e alta sensibilidade analíticas, podendo ser aplicado no diagnóstico de amostras clínicas de seres humanos e animais.

Em razão dos relatos de infecção por *Brucella* em animais marinhos, Norman et al. (2018) realizaram um estudo com PCR em tempo real para verificar se esse teste de diagnóstico é capaz de detectar brucelose em peixes. Foram utilizados *primers* e sondas desenhados para as sequências de inserção *IS711*, com a finalidade de detectar qualquer espécie do gênero *Brucella* e também específicos para a cepa ST27 de *B. ceti* que é considerada zoonótica. Os testes foram aplicados em amostras de DNA extraídas de espécies de peixes comumente consumidos pelos humanos, os quais foram infectados experimentalmente com estirpe de *B. pinnipedialis*, foram utilizados também controles positivos de referência de *B. ceti* e *B. pinnipedialis*. Os

primers direcionados à sequência *ST27* não foram capazes de detectar *B. pinnipedialis*, enquanto que os *primers* desenhados para a sequência de inserção *IS711* apresentaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% em relação ao isolamento de *B. pinnipedialis*. O emprego da PCR em tempo real utilizando *primers* orientados à sequência *IS711*, também poderá auxiliar o estudo epidemiológico da infecção em organismos marinhos.

3 JUSTIFICATIVA

Testes sorológicos usados para a detecção de anticorpos específicos anti-*Brucella* são importantes para o diagnóstico da brucelose em geral, por serem simples e rápidos de realizar e de baixo custo (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). Porém, os testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico da brucelose canina, causada pela *B. canis*, carecem de sensibilidade diagnóstica, já que uma porcentagem significativa dos cães infectados pode apresentar resultados sorológicos negativos (KEID et al., 2009; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015).

A hemocultura é o método de escolha, considerado mais sensível para o diagnóstico da infecção nos cães, devido à prolongada bacteremia, porém, é demorado e trabalhoso. No entanto a bacteremia pode ser intermitente e a redução na quantidade de micro-organismos circulantes no sangue pode gerar resultados falso-negativos. Além disso, há riscos de infecção humana devido à necessidade de manipulação laboratorial de isolados de *Brucella* (UEDA et al., 1974 a,b; CARMICHAEL, 1990; WALLACH et al., 2004; WANKE, 2004; HOLLET, 2006; KEID et al., 2007a,b,c; HOLST et al., 2012; KEID et al., 2015; KEID et al., 2017).

A PCR convencional apresentou elevada concordância em relação à hemocultura para o diagnóstico da brucelose canina (KEID et al., 2007c), com a vantagem de não necessitar da manipulação laboratorial de isolados de *Brucella* e ser um teste mais rápido (ERLICH et al., 1991; BRICKER, 2002; KEID et al., 2007a,b,c; KEID et al., 2015; KEID et al., 2017).

Em vista do exposto, espera-se que a técnica de PCR em tempo real apresente resultados ainda mais promissores do que a PCR convencional para o diagnóstico de brucelose canina. Ressalta-se que a técnica até o momento não foi avaliada como ferramenta diagnóstica para a detecção de *B. canis* em amostras de sangue canino.

Nesta proposta, os *primers* confeccionados, serão direcionados à sequência de inserção da região *IS711* de *Brucella*, um elemento repetido considerado conservado entre as brucelas, que se encontra disperso no genoma bacteriano, sendo que o local de inserção e a quantidade de fragmentos é dependente da espécie de *Brucella* (HALLING; ZEHR, 1990; OUAHRANI et al., 1993; BOUNAADJA et al., 2009; MANCILLA et al., 2011).

Estudos anteriores utilizaram *primers* desenhados para a região ITS de *Brucella* para o diagnóstico da brucelose canina (KEID et al., a,b,c), com altos valores de sensibilidade. Porém, Rocca (2014) observou reações inespecíficas ao aplicar a PCR baseada em *primers* direcionados à região ITS para a investigação de infecção por *Brucella* em mamíferos aquáticos brasileiros, as quais foram atribuídas a reações cruzadas com o micro-organismo *Ochrobactrum intermedium*, o qual apresenta elevada similaridade genética com as bactérias do gênero *Brucella*. Os micro-organismos das espécies *Ochrobactrum intermedium* e *O. anthropi* já foram descritos como causa de infecções em animais e nos humanos, sendo o último já descrito em cães (TEYSSIER et al., 2007; FRANCI et al., 2015).

Batinga et al. (2018, *in press*) e Lima (2018) avaliaram um par de *primers* direcionados à IS711 de *Brucella*, os quais foram desenhados por (BATINGA et al., 2018, *in press*), para o diagnóstico da infecção em amostras de sangue e aspirados de linfonodos caninos, e verificaram altos valores de sensibilidade e especificidade analítica e diagnóstica, sendo estes uma alternativa aos oligonucleotídeos que têm a região ITS de *Brucella* como alvo (KEID et al., 2007c) para o diagnóstico da brucelose canina.

Tendo em vista estes resultados, no presente estudo optou-se por utilizar a IS711 de *Brucella* para o desenho de *primers* e sondas a serem usados na PCR em tempo real. Esta região torna-se interessante para o desenho dos *primers* por terem sido identificadas seis cópias deste elemento na cepa de referência de *B. canis*, podendo resultar num teste altamente sensível e específico.

Há na literatura, reações de PCR em tempo real baseadas na IS711 para a detecção de *Brucella*. Porém, apesar das sequências de inserção serem consideradas conservadas entre as espécies e variantes do gênero, as sequências de nucleotídeos das diferentes cópias de IS711 não são completamente idênticas. Alguns oligonucleotídeos descritos na literatura são complementares a regiões que apresentam mutações nas sequências de *B. canis*, o que poderia influenciar na amplificação. Assim, optou-se por desenhar novos *primers* e sondas para garantir a amplificação das diversas variantes de IS711 descritas nos bancos de dados moleculares maximizando, consequentemente a sensibilidade.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de brucelose canina.

4.2 ESPECÍFICO

Desenhar *primers* e sondas direcionados à sequência de inserção *IS711* para a detecção de *Brucella* spp. utilizando a PCR em tempo real.

Padronizar o teste de PCR em tempo real utilizando-se DNA obtido de *Brucella canis*.

Avaliar o desempenho do teste de PCR em tempo real para detecção de *Brucella* spp. em amostras de DNA obtidas de sangue canino de cães naturalmente infectados, comparando seu desempenho com o desempenho da hemocultura e PCR convencional.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

A coleta das amostras e o uso das mesmas foi Aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (protocolo número CEUA Nº 8401200717).

Foram utilizadas amostras de sangue obtidas de 56 cães (ANEXO), procedentes dos seguintes locais:

- Canil 1: composto por cinco animais considerados livres de brucelose canina, os quais foram submetidos a testes sorológicos baseados em ensaio imunocromatográfico, testes microbiológicos e moleculares para o diagnóstico da brucelose canina nos últimos três anos, apresentando resultados negativos.
- Canil 2: composto por 35 cães, considerado foco de brucelose. No presente estudo foram utilizados 19 cães provenientes deste canil, sendo que destes 19 animais, 12 foram considerados infectados por *B. canis* por apresentarem resultados positivos em testes moleculares e/ou microbiológicos aplicados em amostras de sangue e três cães foram negativos nos testes diretos, mas positivos no teste imunocromatográfico. Os outros quatro cães apresentaram resultados negativos nos testes sorológicos, microbiológicos e moleculares mas são contactantes dos animais infectados (dois deles apresentaram problemas reprodutivos sugestivos de brucelose).
- Canil 3: composto por aproximadamente 80 cães, dos quais 18 foram utilizados no presente estudo. Neste canil, três fêmeas apresentaram falhas reprodutivas, incluindo um abortamento, sendo que o feto foi submetido ao diagnóstico microbiológico e molecular para detecção de *B. canis*, resultando negativo (estas três fêmeas não foram amostras no presente estudo). Os 18 cães amostrados no presente estudo foram negativos no ensaio imunocromatográfico e na hemocultura, enquanto que um deles foi positivo no teste de PCR para detecção de *Brucella*.
- 14 cães de companhia, não reprodutores, dos quais dez não apresentaram sinais clínicos sugestivos de brucelose e foram negativos nos testes sorológicos,

microbiológicos e moleculares; e quatro apresentaram sinais clínicos compatíveis com brucelose (discoespondilite), sendo um deles positivo para brucelose na hemocultura, sorologia e PCR convencional.

As amostras de sangue obtidas de todos os cães foram submetidas previamente à hemocultura para isolamento de *Brucella* spp. conforme o protocolo descrito por Alton et al. (1976) e Lima (2018), empregando-se os meios caldo Triptose e ágar Triptose, ambos acrescidos de 5% de soro fetal bovino e ao procedimento de extração de ácidos nucleicos utilizando o protocolo de pré-lise mecânica e enzimática, seguida pela lise enzimática e purificação com fenol/clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; BATINGA et al., 2017), seguida da PCR convencional empregando os *primers* IS711-517F22 e 755R24 para a detecção de DNA de *Brucella* spp.

Os *primers* usados são direcionados à sequência de inserção IS711 de *Brucella* spp. e a reação foi realizada conforme descrito por Batinga et al. (2018, *in press*). O diagnóstico sorológico da infecção foi realizado previamente utilizando-se o teste imunocromatográfico *Brucella canis Ab test kit* (Bionote, república da Coreia) descrito por KIM et al. (2007).

A amostragem dos cães usados neste estudo, os testes de hemocultura, PCR convencional e os testes sorológicos foram realizados como parte da metodologia da tese de doutorado de Julia Teresa Ribeiro de Lima, intitulada “Avaliação de marcadores sorológicos, microbiológicos e moleculares para diagnóstico da brucelose canina”.

Assim, dos 56 animais utilizados no presente trabalho, 14 foram considerados positivos na hemocultura e/ou PCR convencional, dois foram negativos na PCR convencional e na hemocultura mas positivos no ensaio imunocromatográfico, um foi negativo no ensaio imunocromatográfico, mas positivo na PCR convencional e hemocultura e 39 foram negativos em todos os testes. Todos eles foram avaliados pela PCR em tempo real na presente proposta.

5.2 ANÁLISES LABORATORIAS

5.2.1. Cepas Bacterianas Utilizadas

Para a determinação da sensibilidade analítica da reação de PCR em tempo real, foi utilizada a cepa de referência de *B. canis*, RM6/66 (ATCC 23365).

A cepa, acondicionada em meio caldo triptose (Difco, Detroit, EUA) com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) e 25% de glicerol, à temperatura de -80°C, foi descongelada, semeada em ágar triptose (Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e mantida em aerobiose, a 37°C, por 72 horas.

Após verificação da pureza por meio da coloração de Gram, as colônias bacterianas foram coletadas utilizando-se alça bacteriológica descartável e acondicionadas em microtubo contendo 300 µL de tampão TE (Tris-EDTA, 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e mantidas congeladas até a realização do procedimento de extração de DNA.

5.2.2. Extração de ácidos nucléicos da cepa de *Brucella canis*

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando-se protocolos descritos anteriormente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; KEID et al., 2007c).

A suspensão de *B. canis* obtida conforme o item 5.2.1 foi adicionada ao tampão de lise num volume final de 500 µl contendo 10 mM de Tris-HCl; 25 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 100 mM de cloreto de sódio (NaCl); 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,4 mg/ml de proteinase K. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas *overnight* em termobloco a 37°C.

Após o procedimento de lise, as amostras foram purificadas conforme Ausubel et al. (1995) acrescentando-se 70 µL de NaCl a 5 M e 65 µL de solução com brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) a 1 % e NaCl a 70 mM, sendo incubadas a 65°C, durante 10 minutos.

Em seguida, foram adicionados 640 µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 13.000 x g durante 10 minutos, sendo então a fase aquosa transferida para um novo microtubo, num volume de 500 µL. Em seguida foram acrescentados 500 µL de fenol: clorofórmio (1:1), sendo realizada a homogeneização em vórtex e centrifugação a 13.000 x g durante 5 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida, no volume de 400 µL, para um novo microtubo.

Foram acrescentados 400 µL de clorofórmio e após homogeneização em vórtex, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido num volume de 300 µL para novo microtubo contendo 300 µL álcool isopropílico.

As amostras foram mantidas a -20° C durante 15 minutos e posteriormente foram centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos, sendo o álcool isopropílico removido. Foi acrescido 1 mL de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas novamente a 13.000 x g durante 30 minutos. O etanol 70% foi removido e após a secagem do sedimento de DNA, este foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE, sendo incubado a 56° C durante 20 minutos para ressuspensão.

As amostras de DNA obtidas foram acondicionadas a -20° C até a realização dos procedimentos de quantificação de DNA e preparo das diluições seriadas.

5.2.3. Preparo das suspensões contendo diferentes concentrações de DNA de *Brucella canis*

O DNA extraído obtido da cepa RM6/66 de *B. canis* foi quantificado espectrofotometricamente utilizando-se o equipamento Denovix DS-11 FX (DeNovix Wilmington, USA), obtendo-se uma concentração de 27,601 ng/µl, com razão 260/280 no valor de 1,83 e absorbância a 260 nm de 0,552.

A suspensão de DNA quantificada foi diluída na base 10, utilizando-se tampão TE, obtendo-se 11 suspensões com quantidades decrescentes de DNA (Quadro 4).

As amostras foram acondicionadas a -20° C para posterior reações de amplificação de DNA na determinação da sensibilidade analítica dos *primers* confeccionados.

Quadro 4- Concentração de DNA de *Brucella canis*, cepa RM6/66 em dez diferentes suspensões contendo tampão TE e DNA de sangue canino.

Suspensão	Concentração de DNA
D1	27,601 ng/ μ l
D2	2,7601 ng/ μ l
D3	276,01 pg/ μ l
D4	27,601 pg/ μ l
D5	2,7601 pg/ μ l
D6	276,01 fg/ μ l
D7	27,601 fg/ μ l
D8	2,7601 fg/ μ l
D9	276,01 ag/ μ l
D10	27,601 ag/ μ l
D11	2,7601 ag/ μ l

Fonte: (DINIZ, 2018).

5.2.4. Determinação da sensibilidade analítica da PCR convencional

A reação de PCR convencional já foi previamente analisada quanto à sua sensibilidade analítica no estudo conduzido por Batinga et al. (2018, *in press*). Porém, no presente trabalho a reação foi novamente avaliada quanto à sensibilidade analítica utilizando-se a mesma série de diluições utilizada para determinação da sensibilidade analítica da PCR em tempo real, possibilitando assim uma melhor comparação do desempenho das duas técnicas.

A PCR convencional foi realizada utilizando as suspensões de DNA de *B. canis* D4 a D10, preparadas em tampão TE conforme descrito no item 5.2.3 (Quadro 4). A reação de amplificação foi realizada num volume de 50 μ L, contendo 200 μ M de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM

de $MgCl_2$, 0,6 μM de cada *primer*, 1,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 5 μL de DNA extraído.

As amostras foram amplificadas no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). A reação de amplificação foi conduzida da seguinte forma: desnaturação inicial a 94° C durante 2 minutos; 40 ciclos consistindo de desnaturação a 94° C durante 40 segundos, *annealing* a 59° C durante 40 segundos e extensão a 72° C durante 40 segundos; extensão final a 72° C durante 10 minutos.

As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR convencional podem ser visualizadas no Quadro 5.

5.2.5 Determinação da sensibilidade analítica da *nested*-PCR

Os *primers* 517F22 e 755R24, direcionados à IS711 de *Brucella* spp., desenhados por Batinga et al. (2018, *in press*) foram utilizados no formato de *nested*-PCR e a reação foi avaliada quanto à sua sensibilidade analítica, utilizando-se as suspensões de DNA de *B. canis* D4 a D10 preparadas em tampão TE (Quadro 4).

As condições da primeira amplificação foram as mesmas descritas no item 5.2.4. Já a segunda amplificação foi realizada num volume de 25 μL , utilizando-se os mesmos *primers* e as mesmas concentrações de reagentes empregadas na primeira amplificação, um volume de amostra de 2,5 μL (DNA previamente amplificado) e o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 94° C durante 2 minutos; 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94° C durante 30 segundos, *annealing* a 59° C durante 30 segundos e extensão a 72° C durante 30 segundos; extensão final a 72° C durante 10 minutos.

5.2.6 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados pela PCR convencional e pela *nested*-PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 2,0 % usando tampão de

corrida TBE 1X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8). A eletroforese foi realizada à voltagem constante de 6-7 V/cm e o gel foi imerso em solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL durante 1 hora para visualização dos produtos amplificados em transiluminador ultravioleta (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os produtos amplificados foram comparados ao padrão de peso molecular que com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (pb).

5.2.7. Desenho de *primers* para PCR em tempo real para detecção de *Brucella* spp.

Para o desenho de *primers*, foi primeiramente realizada a busca de sequências de nucleotídeos representando a sequência de inserção *IS711* todas as espécies de *Brucella* no banco de sequências *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997).

As 465 sequências selecionadas foram alinhadas utilizando-se o programa *BioEdit* (HALL, 1990) e com base nos resultados do alinhamento múltiplo, foram escolhidas as regiões para desenho de *primers* e sondas específicos para a detecção de qualquer componente do gênero *Brucella* para utilização na PCR em tempo real empregando-se o sistema *TaqMan*.

Com o emprego do programa Primer3 (KORESSAAR; REMM., 2007, UNTERGASSER et al, 2012) foram desenhados dois conjuntos de *primers*/sondas para serem utilizados na PCR em tempo real (PCRtr-A e PCRtr-B) para a detecção de DNA de *Brucella* spp. a serem utilizados em amostras de sangue caninas.

Além disso, uma das sondas desenhadas foi empregada juntamente com os *primers* desenhados por Batinga et al. (2018, *in press*) num terceiro ensaio de PCR em tempo real (PCRtr-C). As sequências de todos os *primers* e sondas empregados neste estudo podem ser observadas no Quadro 5.

Quadro 5- Sequências dos *primers* e sondas utilizados nos testes de PCR convencional e PCR em tempo real, direcionados à sequência de inserção *IS711* para o diagnóstico de infecção por *Brucella canis* em cães.

Sequência-alvo	Nome do primer	Sequência do primer/sonda (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
PCRc e nested-PCR	517F22	TGTCCGCAAGCTTCAAGCCTTC	262 pb	Batinga et al. (2018, <i>in press</i>)
	755R24	CGGTCAATGTTTTCTCGCATCGCA		
PCRtr-A	687F20	GGCTGTACAAGGAACGCCAT	91 pb	Este estudo
	755R23	GTCAATGTTTTCTCGCATCGCAG		
	710F20	ATTGAATGCTTTTTTAACAA		
PCRtr-B	673F20	AACAATCGACTGGAGGCTGT	103 pb	Este estudo
	755R21	CAATGTTTTCTCGCATCGCAG		
	728R20	CGACGATAGCGTTTCAACTT		
PCRtr-C	517F22	TGTCCGCAAGCTTCAAGCCTTC	262 pb	Este estudo
	755R24	CGGTCAATGTTTTCTCGCATCGCA		
	728R20	CGACGATAGCGTTTCAACTT		

Fonte: (DINIZ, 2018).

Legenda:

PCRc: PCR convencional

PCRtr: PCR em tempo real

pb: pares de bases

5.2.8. Padronização das reações de PCR em tempo real e determinação da sensibilidade analítica da reação

As três diferentes reações de PCR em tempo real, PCRtr-A, B e C (Quadro 5) foram realizadas num volume final de 20 µl, consistindo de 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master 2X (Roche, Life Science, Brasil), 900 nM de cada *primer*, 200 nM de sonda e 5 µl de amostra de DNA.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), sendo utilizadas as seguintes condições: pré-incubação a 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, *annealing* durante 60 segundos e extensão a 72° C durante 1 segundo.

As reações PCRtr-A e PCRtr-B, cujos *primers* e sondas foram desenhados neste estudo, foram realizadas em duas diferentes temperaturas de *annealing*, 54°C e 59°C. Já a PCRtr-C foi realizada apenas a 59°C, uma vez que esta reação foi baseada nos mesmos *primers* empregados na PCR convencional, cuja temperatura de *annealing* ótima (59°C) já foi determinada no estudo de Batinga et al. (2018, *in press*).

A três reações foram comparadas quanto à eficiência de amplificação nas diferentes temperaturas de *annealing*, após o estabelecimento da curva padrão, a qual foi determinada utilizando-se as suspensões D4 a D8 de DNA de *B. canis*, preparadas em tampão TE (Quadro 4). A sensibilidade analítica das reações também foi determinada. Para a determinação da curva padrão, cada suspensão foi testada em triplicata.

5.2.9. Aplicação das reações de PCR convencional, PCR em tempo real e *nested-PCR* para a detecção de *Brucella* spp em amostras de sangue canino.

A reação de PCR em tempo real que apresentou melhor eficiência na amplificação, conforme determinado no item 5.2.8, foi escolhida para a detecção de *Brucella* spp em um painel de amostras de DNA obtidas de sangue canino e seus respectivos controles negativo de extração, bem como um controle negativo de amplificação composto por água ultrapura. Todas as amostras caninas foram testadas em duplicata pela PCR em tempo real.

Estas amostras caninas foram previamente testadas pela PCR convencional, hemocultura e pelo teste imunocromatográfico como parte da tese de doutorado de Lima (2018).

Já a reação de *nested*-PCR foi realizada apenas nas amostras de DNA de sangue canino que apresentaram resultado positivo na PCR em tempo real, porém negativo na PCR convencional, com o objetivo de confirmar os resultados discrepantes.

5.2.10. Alteração das condições de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) na tentativa de aumentar a especificidade de reação

A PCRtr-B foi retestada, utilizando-se o mesmo ciclo de amplificação descrito no item 5.2.8, porém reduzindo-se a concentração de *primers*, com o objetivo de aumentar sua especificidade.

A reação foi realizada em suspensões contendo diferentes concentrações de DNA de *B. canis* (D4 a D11), conforme descrito no Quadro 4 e num painel de oito amostras de DNA obtidas de sangue canino, sendo seis provenientes de cães não infectados por *B. canis* e duas provenientes de cães positivos para brucelose canina pelo teste de hemocultura e PCR convencional. Além disso, foram incluídos os controles negativos referentes a cada lote de amostras de DNA canino extraída e um controle negativo de amplificação, composto por água ultrapura.

Assim, as reações foram realizadas nas seguintes condições: volume final de 20 µl, consistindo de 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master 2X (Roche, Life Science, Brasil) 200 nM de cada *primer*, 200 nM de sonda e 5 µl de cada amostra de DNA. O ciclo utilizado para a amplificação foi o mesmo descrito no item 5.2.8, utilizando-se a temperatura de *annealing* de 59° C.

5.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.3.1. Análise da eficiência das reações de PCR em tempo real

Ao analisar o desempenho da reação são considerados os valores de eficiência, que são calculados a partir da inclinação das curvas padrões geradas (*slope*). A eficiência da reação (E) deve ser próxima a 100%, indicando que a cada ciclo a quantidade de produto amplificado duplica. Para uma eficiência de 100%, o valor de *slope* é -3.32. Uma reação com bom desempenho deve apresentar eficiência entre 90% e 110%, que corresponde a valores de *slope* entre -3.58 e -3.10.

Outro parâmetro a ser considerado ao analisar o desempenho da reação é o ponto de Cp (*crossing point*), que corresponde ao número de ciclos que devem ocorrer para que a fluorescência seja detectável, ou seja aumente acima do nível basal. Durante a reação é possível identificar três fases: exponencial, na qual a fluorescência se torna detectável, linear na qual também há detecção de fluorescência, mas com baixa eficiência e a fase estacionária na qual há ausência de amplificação (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006). Assim, a determinação do Cp ocorre no início da fase exponencial da reação e seu valor depende da quantidade inicial de amostra.

Para a análise dos resultados da PCR em tempo real foi utilizado o método da segunda derivada máxima da função entre fluorescência e ciclo de amplificação (citar Roche). O Cp é o valor correspondente ao primeiro pico de fluorescência máxima da segunda derivada. Este pico corresponde ao início da fase logarítmica de amplificação. Este método é totalmente independente de parâmetros definidos pelo usuário, como definição linha “threshold” e definição de linha de base normalmente necessários em outros métodos de análise (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

Quanto menor o valor de Cp para uma dada amostra, mais precocemente ocorre a detecção de fluorescência (em relação ao número de ciclos). Assim, o valor médio de Cp para as triplicadas representando cada uma das amostras utilizadas na confecção da curva padrão foi determinado, juntamente com o desvio-padrão e a correspondente concentração média de DNA.

5.3.2. Análise da concordância entre os resultados obtidos nos diferentes testes diagnósticos aplicados às amostras caninas

Os resultados obtidos na PCR em tempo real, PCR convencional e hemocultura aplicados ao diagnóstico da brucelose em amostras de sangue canino foram comparados dois a dois empregando-se o coeficiente *Kappa* (COHEN, 1960), para determinação das concordâncias obtidas e esperadas.

6 RESULTADOS

6.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS REAÇÕES DE PCR CONVENCIONAL E NESTED-PCR

As reações de PCR convencional e *nested*-PCR possibilitaram a detecção de até 0,27 fg/ μ L de DNA de *B. canis*, o que equivale à diluição D9 testada (Figuras 1 e 2).

Figura 1- sensibilidade analítica da reação de PCR convencional empregando os *primers* 517F22 e 755R24 utilizando diferentes concentrações de DNA de *B. canis* (cepa RM6/66).

Fonte: (DINIZ, 2018)

Legenda:

- 1- D4 (27,601 pg/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 2- D5 (2,7601 pg/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 3- D6 (276,01 fg/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 4- D7 (27,601 fg/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 5- D8 (2,7601 fg/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 6- D9 (276,01 ag/ μ L): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 7- D10 (27,601 ag/ μ L): resultado negativo (ausência do produto amplificado de 262 pb)
- 8- Controle negativo de amplificação (água ultrapura)
- 9- Marcador de peso molecular de 100 pb

Figura 2- sensibilidade analítica da reação de *Nested-PCR* empregando os *primers* 517F22 e 755R24 utilizando diferentes concentrações de DNA de *B. canis* (cepa RM6/66).

Fonte: (DINIZ, 2018)

Legenda:

1- Controle negativo de amplificação (água ultrapura)

2- Vazio

3- D4 (27,601 pg/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

4- D5 (2,7601 pg/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

5- D6 (276,01 fg/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

6- D7 (27,601 fg/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

7- D8 (2,7601 fg/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

8- D9 (276,01 ag/μl): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)

9- D10 (27,601 ag/ μl): resultado negativo (ausência do produto amplificado de 262 pb)

10- Marcador de peso molecular de 100 pb

6.2 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL E APLICAÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO PARA DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS DE SANGUE CANINO

As curvas de amplificação para as reações PCRtr-A e PCRtr-B realizadas nas temperaturas de *annealing* de 54° C e 59° C e da PCRtr-C realizada na temperatura de *annealing* de 59° C, todas elas utilizando 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, aplicadas nas suspensões de DNA de *B. canis* em diferentes concentrações podem ser visualizadas nas Figuras 3 a 6.

Já a curva de amplificação para a reação PCRtr-B gerada na temperatura de *annealing* de 59° C, utilizando 200 nM de *primers* e 200 nM de sonda, aplicada nas suspensões de DNA de *B. canis* em diferentes concentrações pode ser visualizada na Figura 8.

Nas Figuras 3 a 7 é possível avaliar, para cada reação a existência do padrão exponencial de amplificação, a fluorescência máxima obtida e a ocorrência da fase de platô na reação.

Figura 3- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-A) à temperatura de *annealing* de 54° C, com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D11.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Figura 4- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de *annealing* de 54° C, com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D11.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Figura 5- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-A) à temperatura de *annealing* de 59° C, com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D10.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Figura 6- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de *annealing* de 59° C, com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D9.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Figura 7- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-C) à temperatura de *annealing* de 59° C, com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D10.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Figura 8- curva de amplificação da PCR em tempo real (PCRtr-B) à temperatura de *annealing* de 59° C, com 200 nM de *primers* e 200 nM de sonda, utilizando as suspensões de DNA de *Brucella canis* D4 a D11.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Os valores de eficiência e *slope*, gerados após a determinação da curva padrão de cada uma das reações de PCR, bem como o limiar de detecção das mesmas podem ser visualizados na Quadro 6.

Quadro 6- Valores de eficiência, *slope* e limiar de detecção das reações de PCR em tempo real.

Reação	Diluições usadas para determinação da curva-padrão	Eficiência da reação (E)	Valor do <i>slope</i>	Limiar de detecção da reação
PCRtr-A a 54° C 900 nM de <i>primers</i>	D4 a D7	2,154 (115%)	- 3,001	D8 (2,76 fg/μl)
PCRtr-A a 59° C 900 nM de <i>primers</i>	não calculada	não calculada	não calculado	não determinado
PCRtr-B a 54° C 900 nM de <i>primers</i>	D4 a D7	2,123 (112%)	- 3,058	D8 (2,76 fg/μl)
PCRtr-B a 59° C 900 nM de <i>primers</i>	D4 a D8	2,031 (100%)	- 3,250	D9 (0,276 fg/μl)
PCRtr-B a 59° C 200 nM de <i>primers</i>	D4 a D8	1,979 (97,9%)	- 3,374	D9 (0,276 fg/μl)
PCRtr-C a 59° C 900 nM de <i>primers</i>	D4 a D8	1,839 (83,9%)	- 3,780	D9 (0,276 fg/μl)

Fonte: (DINIZ, 2018)

Na Tabela 1, podem ser visualizados, para cada uma das reações, os valores médios de Cp das triplicatas equivalentes a cada uma das diluições de DNA de *B. canis* utilizadas para determinação das curvas padrões, bem como a média das concentrações correspondentes e os valores dos desvios-padrão.

Tabela 1- valor do *crossing point* (Cp) das triplicatas equivalentes a cada uma das diluições de DNA de *B. canis* utilizadas para determinação das curvas padrões das reações, bem como as concentrações correspondentes e os respectivos valores de desvio-padrão.

Reação	Triplicata de cada diluição de DNA de <i>Brucella canis</i>	Média do Cp	Desvio padrão do Cp	Média da concentração (pg/μl)	Desvio padrão da concentração
PCRtr-A 54° C 900 nM primer	D4	26,98	0,02	27,36	0,428
	D5	30,12	0,36	2,50	0,663
	D6	32,48	0,188	0,250	0,05
	D7	34,09	0,248	0,030	0,012
PCRtr-B 54° C 900 nM primer	D4	24,76	0,037	28,96	0,823
	D5	27,97	0,016	2,56	0,031
	D6	30,92	0,07	0,27	0,015
	D7	32,92	0,089	0,02	0,003
PCRtr-A 59° C 900 nM primer	D4				
	D5	não calculado	não calculado	não calculado	não calculado
	D6				
	D7				
PCRtr-B 59° C 900 nM primer	D4	24,8	0,07	27,8	1,374
	D5	28,2	0,048	2,576	0,088
	D6	31,3	0,078	0,276	0,015
	D7	33,6	0,122	0,025	0,004
	D8	35,3	0,496	0,002	0,001
PCRtr-C 59° C 900 nM primer	D4	27,0	0,06	27,61	1,022
	D5	30,8	0,064	2,761	0,108
	D6	33,7	0,018	0,282	0,004
	D7	35,8	0,35	0,035	0,014
	D8	37,8	0,196	0,002	0,0006
PCRtr-B 59° C 200 nM primer	D4	22,55	0,008	27,555	0,153
	D5	25,92	0,021	2,759	0,04
	D6	29,3	0,12	0,275	0,022
	D7	32,12	0,086	0,03	0,002

Fonte: (DINIZ, 2018)

Legenda: Cp: *crossing point*

Tendo em vista os resultados obtidos na etapa de padronização das três reações de PCR em tempo real em diferentes condições, verificou-se que a PCRtr-B

realizada à temperatura de 54° C e utilizando 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda apresentou elevada eficiência, fluorescência máxima mais elevada em relação às demais, baixo valor de Cp na concentração D4 (24,76) e valor de sensibilidade analítica equivalente às demais reações. Assim, esta reação foi escolhida para ser aplicada nas amostras de DNA obtidas de canino para a detecção de *B. canis*.

Ao testar a PCRtr-B utilizando a temperatura de *annealing* de 54° C (com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda) em 46 amostras de DNA obtidas de sangue canino para a detecção de *Brucella* spp. foi observado que a concordância, determinada pelo coeficiente *Kappa*, entre a PCRtr-B e a PCRC foi considerada substancial (K=0,62) enquanto que entre a PCRtr-B e a hemocultura foi considerada substancial (K=0,72).

Dos 14 cães avaliados que foram positivos na hemocultura e/ou PCR convencional aplicada em amostras de sangue, sete (50%) foram negativos na PCRtr-B, enquanto que nenhum dos animais que foram negativos na PCR convencional e na hemocultura apresentaram resultado positivo na PCRtr-B (Tabela 2), sugerindo uma baixa sensibilidade diagnóstica da reação PCRtr-B.

Tabela 2- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRC) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de *annealing* de 54°C e utilizando-se 900 nM de *primers* em 46 amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de *Brucella* spp.

	Hemocultura positivo e PCRC positivo	Hemocultura positivo e PCRC negativo	Hemocultura negativo e PCRC positivo	Hemocultura negativo e PCRC negativo	Total
PCRtr-B positivo	7	0	0	0	7
PCRtr-B negativo	3	1	3	32	39
Total	10	1	3	32	46

Fonte: (DINIZ, 2018)

Na tentativa de melhorar a sensibilidade da reação, a PCRtr-B (com 900 nM de *primers* e 200 nM de sonda) foi repetida, porém utilizando a temperatura de *annealing* de 59° C, uma vez que esta reação, apesar de ter apresentado fluorescência máxima um pouco inferior, os valores de eficiência e sensibilidade analítica foram similares à reação anterior.

Assim, a reação foi aplicada em 28 amostras de DNA obtidas de sangue canino para a detecção de *Brucella* spp e verificou-se concordância moderada (K = 0,51) em

relação à PCRC e concordância moderada em relação à hemocultura ($K=0,44$), de acordo com o coeficiente *Kappa*.

Dos nove cães avaliados que foram positivos na hemocultura e/ou PCR convencional aplicada em amostras de sangue, oito (88,9%) foram positivos na PCRtr-B, enquanto que sete cães que foram negativos na PCR convencional e na hemocultura apresentaram resultado positivo na PCRtr-B (Tabela 3), sugerindo uma maior sensibilidade da PCRtr-B realizada à temperatura de *annealing* de 59°C.

Das 28 amostras testadas pela PCRtr-B a 59°C, 21 foram previamente testadas também a 54° C, sendo que seis foram reagentes nas duas reações e seis foram reagentes apenas da reação a 59° C.

Tabela 3- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRC) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de *annealing* de 59°C e utilizando-se 900 nM de *primers* em 28 amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de *Brucella* spp.

	Hemocultura positivo e PCRC positivo	Hemocultura positivo e PCRC negativo	Hemocultura negativo e PCRC positivo	Hemocultura negativo e PCRC negativo	Total
PCRtr-B positivo	8	0	0	7	15
PCRtr-B negativo	0	1	0	12	13
Total	8	1	0	19	28

Fonte: (DINIZ, 2018)

Apesar da elevada sensibilidade verificada, quatro controles negativos do procedimento de extração apresentaram fluorescência na PCRtr-B realizada à temperatura de 59° C, os quais foram classificados como positivos.

A reação de *nested*-PCR, foi realizada em cinco amostras de DNA obtido de sangue canino que apresentaram resultados discordantes entre a PCRC/hemocultura e PCRtr (positivas pela PCRtr-B realizada à 59°C e negativos na PCRC e na hemocultura) assim como nas três amostras de controle negativo de extração que apresentaram amplificação na PCRtr-B realizada à 59° C, sendo que destas, apenas uma amostra de sangue canino apresentou o produto amplificado de 262 pb, que é esperado na reação de *nested*-PCR (Figura 9).

Figura 9 - reação de *Nested-PCR* empregando os *primers* 517F22 e 755R24, direcionados à sequência de inserção *IS711* para detecção de *Brucella* spp. em amostras de DNA obtidos de sangue canino.

Fonte: (DINIZ, 2018)

Legenda:

- 1- Controle positivo (DNA extraído de *Brucella canis*, cepa RM6/66): resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 2- Vazio
- 3- Amostra de DNA de sangue canino do animal 69/16: resultado positivo (produto amplificado de 262 pb)
- 4- Controle negativo de extração 1 (tampão TE): resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 5- Controle negativo de extração 2 (tampão TE): resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 6- Amostra de DNA de sangue canino do animal 161/16: resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 7- Controle negativo de extração 3 (tampão TE): resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 8- Controle negativo de extração 4 (tampão TE): resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 9- Amostra de DNA de sangue canino do animal 29/16: resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 10- Amostra de DNA de sangue canino do animal 16/16: resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 11- Amostra de DNA de sangue canino do animal 15/16: resultado negativo (ausência de produto amplificado de 262 pb)
- 12- Marcador de peso molecular de 100 pb

Tendo em vista que a sensibilidade analítica da reação de *nested-PCR* foi considerada similar à sensibilidade analítica das reações de PCRtr realizadas, os resultados positivos verificados na PCRtr-B nas amostras de DNA de sangue canino e nas amostras controle negativo (as quais foram negativas pela *nested-PCR*) foram

considerados resultantes de reações inespecíficas na PCRtr-B realizada com temperatura de *annealing* de 59° C e utilizando 900 nM de *primers*.

Dessa maneira, na tentativa de aumentar a especificidade na detecção de *B. canis* em amostras caninas, a PCRtr-B utilizando temperatura de *annealing* de 59° C e uma concentração de *primers* de 200 nM no tampão de amplificação (item 5.2.10) foi realizada em oito amostras de DNA obtidas de sangue canino.

Das oito amostras, duas amostras apresentaram resultado positivo na PCRtr-B, porém negativo nos testes de hemocultura e PCR convencional (Tabela 4). Uma destas amostras foi procedente de um animal oriundo de um canil considerado foco de brucelose (canil 2), porém de um animal que foi negativo nos testes de PCRC, hemocultura e no sorodiagnóstico. A segunda amostra foi proveniente de um animal procedente do canil 1 (considerado livre de infecção). Esta última amostra, porém, não apresentou amplificação do produto de 262 pb, considerado específico de *Brucella* spp. na reação de *nested*-PCR.

Tabela 4- Resultados dos testes de hemocultura, PCR convencional (PCRC) e PCR em tempo real utilizando o protocolo B (PCRtr-B) realizado à temperatura de *annealing* de 59°C e utilizando-se 200 nM de *primers* em oito amostras de DNA obtidas de sangue canino, para a detecção de *Brucella* spp.

	Hemocultura positivo e PCRC positivo	Hemocultura positivo e PCRC negativo	Hemocultura negativo e PCRC positivo	Hemocultura negativo e PCRC negativo	Total
PCRtr-B positivo	1	0	0	2	3
PCRtr-B negativo	0	0	0	5	5
Total	1	0	0	7	8

Fonte: (DINIZ, 2018)

7 DISCUSSÃO

Dos três conjuntos de *primers*/sonda desenvolvidos para uso na PCR em tempo real (A, B e C), avaliados do ponto de vista analítico utilizando-se diferentes condições de amplificação (diferentes temperaturas de *annealing*) e com 900 nM de *primers*, verificou-se que a PCRtr-A não resultou em amplificação das amostras de DNA de *B. canis* à temperatura de 59° C, não sendo, portanto, calculada a curva padrão desta reação.

A PCRtr-C apresentou pior desempenho em relação às reações usando os *primers*/sondas A e B, apesar dos valores de sensibilidade analítica terem sido semelhantes. A curva padrão desta reação indicou eficiência de 83,9% e valor de C_p na diluição D4 de 27,0 (Tabelas 1 e 2), indicando que a fluorescência foi detectada mais tardiamente (apenas no ciclo 27 de amplificação). A menor eficiência em relação às demais reações pode estar relacionada ao maior produto amplificado nesta reação (262 pb). Ao avaliar a curva de amplificação desta reação verificou-se a inexistência da fase de platô na reação de amplificação (Figura 7) o que pode ser consequência de extensão insuficiente. Diferentemente da PCR convencional, cujos ciclos de amplificação em geral preveem períodos de extensão em média de 20 segundos a 1 minuto, na PCR em tempo real, a mesma temperatura é utilizada para o *annealing* e a extensão das fitas de DNA. Por esta razão, os protocolos de PCR em tempo real baseados no sistema *TaqMan* são indicados geralmente para amplificar fragmentos de até 200 pb (INNIS; GELFAND, 1990; RYCHLIK; SPENCER; RHOADS, 1990).

Quando avaliadas à temperatura de *annealing* de 54° C, a PCRtr-A teve eficiência de 115 % e valor de C_p de 26,78 na diluição D4, valores similares aos obtidos ao avaliar a PCRtr-B nas mesmas condições de amplificação, que mostrou eficiência de 112 % e valor de C_p de 24,76 na diluição D4. O limiar de detecção das reações foi similar (Quadro 6 e Tabelas 1).

Assim, a escolha da PCRtr-B para detecção de *B. canis* nas amostras de DNA caninas foi baseada nos valores máximos de fluorescência observados nas curvas de amplificação, que foram maiores na reação B do que na A. Além disso, a fase de platô não foi evidenciada na reação A (Figuras 3 e 4). Apesar disso, a sensibilidade da PCRtr-B (utilizada com temperatura de *annealing* de 54° C) foi considerada baixa

quando empregada para a detecção de *B. canis* em amostras de sangue canino, tendo desempenho inferior aos testes de PCR convencional e hemocultura (Tabela 3).

Verificou-se, porém, que a PCRtr-B detectou um maior número de amostras caninas como positivas quando utilizada com temperatura de *annealing* de 59° C. A curva-padrão desta reação indicou eficiência de 100 % e valor de Cp de 24,8 na D4 (Quadro 6 e Tabela 1).

Nas reações moleculares de amplificação de DNA pela enzima polimerase, usualmente considera-se que as reações tendem a se tornar mais específicas com o aumento da temperatura de *annealing*, pois temperaturas mais elevadas de *annealing* resultam em maior estringência na reação (INNIS; GELFAND, 1990; RYCHLIK; SPENCER; RHOADS, 1990). A dinâmica da reação de PCR em tempo real, porém é distinta da dinâmica da reação de PCR convencional, devido ao uso da sonda, que é responsável pela emissão do sinal fluorescente. O aumento da temperatura pode reduzir o pareamento inespecífico da sonda, aumentando assim sua disponibilidade para amplificação do produto específico e, portanto, a sensibilidade da reação, o que poderia explicar o maior número de amostras detectadas como positivas pela PCRtr-B à 59° C de temperatura de *annealing*, quando comparada com 54° C.

Diversos estudos apontam a PCR em tempo real como um método de diagnóstico seguro, ágil e confiável (DEBEAUMONT; FALCONNET; MAURIN, 2005; KATTAR et al., 2007; BOUNAADJA et al., 2009; SOHRABI et al., 2014; HÄNSEL et al., 2015; KHAMESIPOUR, 2015; KADEN et al., 2017; LINDAHL-RAJALA et al., 2017), no entanto, ao longo deste estudo foi observado que o método apresentou falhas, uma vez que houve amplificação de alguns controles negativos da extração e também amplificação de diversas amostras que tinham sido negativas nos outros testes usados para diagnóstico de infecção por *B. canis* (hemocultura e PCR convencional).

Devido, principalmente à ocorrência de reação nos controles negativos, a despeito de todos os cuidados laboratoriais tomados para reduzir as chances de contaminações laboratoriais durante o processamento das amostras, aventou-se a hipótese de que estes resultados pudessem ser consequência de contaminações laboratoriais pelo próprio DNA alvo da reação, as quais seriam detectadas pela PCR em tempo real, mas não pela PCR convencional.

Contudo, uma série de cuidados foram tomados durante o processamento das amostras, tornando reduzidas as chances de ocorrência deste tipo de problema: foram utilizadas salas separadas para os procedimentos de preparo das soluções de

amplificação, aplicação das amostras de DNA nas soluções de amplificação, extração de DNA e manipulação de amostras pós-amplificação; controles negativos (água ultrapura) foram incluídos durante os procedimentos de extração das amostras (um controle a cada três ou quatro amostras teste) e também durante o procedimento de amplificação, como maneira de avaliar a qualidade dos reagentes utilizados nos diferentes procedimentos, bem como de monitorar o manuseio das amostras; todos os reagentes de uso molecular foram acondicionados em frascos estéreis e descartáveis, livres de DNase e RNase; as superfícies de trabalho nas áreas laboratoriais foram descontaminadas diariamente, utilizando-se luz ultravioleta e solução de hipoclorito de sódio; as partidas de reagentes utilizadas em cada um dos procedimentos laboratoriais foram registradas, com a finalidade de permitir o rastreamento de eventuais problemas.

Um outro ponto que permitiu descartar a possibilidade de contaminação laboratorial das amostras foram os resultados negativos gerados quando estas amostras foram avaliadas pela *nested*-PCR.

Assim, a hipótese mais plausível para explicar estes resultados discordantes e a reatividade nas amostras controle negativo foi a inespecificidade do sistema de detecção, gerando produtos inespecíficos. Diversos fatores podem contribuir para a ocorrência de reações inespecíficas nos testes moleculares, assim algumas hipóteses foram sugeridas para esclarecer o ocorrido nas reações de qPCR apresentadas neste trabalho.

Primeiramente, concentrações elevadas de oligonucleotídeos podem gerar artefatos, com amplificações inespecíficas e aparecimento de *primer-dimer* (dimerização de *primer*) que eventualmente podem atuar como sítios para ligação das sondas (WATSON, 1989; INNIS; GELFAND, 1990; BROWNIE et al., 1997). Diferentemente do que ocorre na PCR convencional, a revelação da amplificação não é baseada na visualização de produto de tamanho específico no gel de agarose, mas sim na emissão de fluorescência por ação da sonda, de maneira que a ligação dos *primers* e da sonda em locais não específicos poderá emitir fluorescência, ainda que o produto amplificado gerado não apresente o mesmo tamanho do produto esperado.

Na tentativa de aumentar a especificidade da reação, a concentração dos *primers* foi reduzida, sendo que o oligonucleotídeos são os únicos itens da reação que são passíveis de se alterar, visto que os outros reagentes estão presentes numa

mesma solução em concentração pré-estabelecida pelo fabricante do *kit* de amplificação utilizado.

Assim a redução da concentração dos *primers* foi realizada na tentativa de aumentar a especificidade por diminuir a atividade deste componente na reação que pode gerar amplificações inespecíficas ou levar à formação de quantidade excessivas de dímeros de *primers* que eventualmente podem atuar como sítios de ligação para as sondas, gerando fluorescência (WATSON, 1989; INNIS; GELFAND, 1990; BROWNIE et al., 1997).

A PCRtr-B realizada em temperatura de *annealing* de 59° C e com 200 nM de *primers*, quando avaliada na diluição seriada de DNA de *B. canis*, apresentou curva padrão com alta eficiência de amplificação (97,9%) e valor de Cp na D4 de 22,55, além de uma sensibilidade analítica compatível com as demais reações (Quadro 6 e Tabela 1). Porém, os valores de fluorescência máxima detectada foram mais baixos do que os verificados nas condições anteriormente testadas, usando 900 nM de *primers* (Figura 8). A reação foi avaliada num painel de oito amostras de DNA obtidas de sangue canino para a detecção de *B. canis*, sendo verificada a amplificação de uma amostra proveniente de cão não infectado (proveniente do canil 1), a qual não se apresentou positiva na reação de *nested-PCR*, sendo um indicativo de que reações inespecíficas ainda possam ocorrer com reduzidas quantidades de *primers*.

Outra possível causa de amplificações inespecíficas seria a presença, nas amostras, de micro-organismos geneticamente similares do gênero *Brucella* podendo ser detectados pela reação. Os *primers* e sondas foram desenhados tendo como alvo uma região (*IS711*) que é altamente conservada nos organismos do gênero *Brucella*, sendo sua sequência considerada exclusiva deste gênero (HALLING; TATUM; BRICKER, 1993; OUAHRANI et al., 1993; OCAMPO-SOSA; GARCÍA-LOBO, 2008; BOUNAADJA et al., 2009; MANCILLA et al., 2011). Na avaliação *in silico* dos *primers* e sondas desenhados, não foi verificada possibilidade de amplificação inespecífica. Contudo, não se pode descartar a hipótese de amplificação de microrganismos geneticamente relacionados com o gênero *Brucella* e que não tenham sido descritos nos bancos de sequência

Cabe ainda ressaltar que as brucelas pertencem à classe Alpha-proteobacteria, que contempla inúmeras bactérias ambientais, comumente encontradas no solo e água, podendo atuar como contaminantes da água e reagentes utilizados nos procedimentos moleculares, uma vez que os mesmos não são realizados em

ambientes completamente estéreis. As bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Ochrobactrum* já foram descritas em reações inespecíficas (TEYSSIER et al., 2007; ROCCA, 2014; FRANCI et al., 2015).

Apesar de ter sido utilizado um painel com pequeno número de amostras caninas (oito amostras) para avaliar o desempenho da PCRtr-B com reduzida concentração de *primers*, os resultados observados com esta reação (amplificação de uma amostra proveniente de animal livre da infecção), quando analisados em conjunto com os resultados obtidos na reação anteriormente realizada (PCRtr-B utilizando maiores concentrações *primers*), em que verificou-se amplificação de amostras controle negativo, foram considerados sugestivos da pouca especificidade do sistema, não justificando sua aplicação num maior número de amostras caninas.

Sendo assim, a PCRtr-B foi considerada uma reação de elevada eficiência, elevada sensibilidade analítica e possivelmente elevada sensibilidade diagnóstica, porém há indicativos de que sua especificidade possa ser baixa para ser utilizada para diagnóstico molecular da brucelose em amostras caninas.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A PCRtr-B conduzida a 59^o C utilizando uma concentração de *primers* de 900 nM, apresentou desempenho analítico superior às demais reações de PCRtr analisadas, com alta eficiência de amplificação e elevada sensibilidade analítica.
- A PCRtr-B possibilitou a detecção de um maior número de animais positivos para brucelose canina em relação à PCRC e hemocultura, indicando elevada sensibilidade do teste.
- Apesar da elevada sensibilidade da PCRtr-B, o teste não se apresentou confiável, uma vez que ocorreram reações inespecíficas nas amostras de controle negativo usados durante o processo de extração.
- Os métodos de PCRtr com emprego de *primers* desenhados para a sequência de inserção *IS711* avaliados neste estudo não apresentaram desempenho satisfatório que permita ser utilizado como um teste de diagnóstico alternativo aos testes de hemocultura e PCRC.

REFERÊNCIAS

ABINPET, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. Dados do Mercado, 2016. Disponível em <http://abinpet.org.br/site/mercado/> Acesso em 24/01/2018.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Brucelosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. In: _____. 2. ed. Washington: Oficina Panamericana de la Salud, 1986. p. 14-36.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, A. S.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; CRUZ, T. F.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A. C.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1216-1219, 2005.

ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1976. p. 109.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.

ALVES, C. J.; ALVES, F. A. L.; GOMES, A. A. B.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, J. S. L.; SANTOS, F. A. Aspectos Epidemiológicos de *Brucella canis* em Patos, Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 13, n. 1, p. 45-49, 2003.

ARAS, Z.; UÇAN, U. S.; Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 658-662, 2010.

ARESE, A.; CRAVERO, S.; BOSCHIROLI, M.; CAMPOS, E.; SAMARTINO, L.; ROSSETTI, O. Uso de uma proteína recombinante de *Brucella abortus* para el diagnóstico de la brucelosis em diferentes especies animales. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 31, p. 36-39, 1999.

ATTADEMO, F. L. N.; SILVA, J. C. R.; LUNA, F. O.; IKEDA, J.; FOPPEL, E. F. C.; SOUSA, G. P.; BÔAVIAGEM-FREIRE, A. C.; SOARES, R. M.; FAITA, T.; BATINGA, M. C. A.; KEID, L. K. Retrospective survey for pathogens in stranded marine mammals in northeastern Brazil: *Brucella* spp. infection in a Clymene Dolphin (*Stenella clymene*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 1, p. 151-155, 2018.

AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, A. S.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p.156-160, 2003.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUH, K, editors. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, New York. 1995, p. 836.

BADAKHSH, F. F.; CARMICHAEL, L. E.; DOUGLASS, J. A. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, p. 286–289, 1982.

BAEK, B. K.; LIM, C. W.; RAHMAN, M. S.; KIM, C. H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 4, p. 312-314, 2003.

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

BATINGA, M. C. A. **Diagnóstico Molecular Comparativo da Brucelose Canina pela Aplicação das Técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Amplificação Isotérmica do DNA Mediada por LOOP (LAMP)**. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BATINGA, M. C. A.; LIMA, J. T. R.; GREGORI, F.; DINIZ, J. A.; MUNER, K.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M.; KEID, L. B. Comparative application of IS711-based polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for canine brucellosis diagnosis. **Molecular and Cellular Probes**, 2018. *In press*.

BATINGA, M. C. A, DOS SANTOS, J. C.; LIMA, J. T. R.; BIGOTTO, M. F. D.; MUNER, K.; FAITA, T.; SOARES, R. M.; DA SILVA, D. A. V.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; DINIZ, J. A.; KEID, L. B. Comparison of three methods for recovery of *Brucella canis* DNA from canine blood samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 143, p. 26-31, 2017.

BERTHELOT, X.; BASTUJI, B. G. A Brucelose do cão. **A hora Veterinária**, v. 2, n. 92, p. 47- 50, 1996.

BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; HÉNAULT, S.; ZYGMUNT, M. S.; POLIAK, S.; GARIN-BASTUJI, B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of *IS711*, *bcsp31* and *per* target genes. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 156–164, 2009.

BRAGA, J. F. V.; TEIXEIRA, M. P. F.; FRANKLIN, F. L. A. A.; SOUZA, J. A. T.; SILVA, S. M. M. S.; GUEDES, R. M. C. Soroprevalência de pseudorraiva, peste suína clássica e brucelose em suínos do estado do Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1321-1328, 2013.

BRAGA, R. S. Mercado *Pet* e o Marketing de relacionamento. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 75, p. 41-46, 2017.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-446, 2002.

BROWNIE, J.; SHAWCROSS, S.; THEAKER, J.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.; NEWTON, C.; LITTLE, S. The elimination of *primer*-dimer accumulation in PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 16, p. 3235-3241, 1997.

BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* n. sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **The Journal of Hygiene**, v. 54, n. 3, p. 351-364, 1956.

CARDOSO P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, London, v. 5, n. 13, 2006.

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

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR. (Ed). **Animal brucellosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990. p. 335-350.

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

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

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. **Cornell Veterinarian**, v. 77, p. 3-12, 1987.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C.; JONES, L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 373-87, 1989.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 573-584.

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

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of dog and cat. 4. ed. **Missouri: Saunders**, 2012, p. 398-411.

CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine Abortion Caused by *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 152, n. 6, p. 605-616, 1968.

CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1726-1734, 1970.

CARMICHAEL, L. E.; SHIN, S. J. Canine Brucellosis: A Diagnostician's Dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 161-165, 1996.

CARMICHAEL L. E, ZOHA S. J, FLORES-CASTRO R. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. **Development in Biological Standartization**, v. 56, p. 649-56, 1984.

CARVALHO, M. R.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; DIAS, H. L.; LIMA, E. S. C. Ocorrência da *Brucella canis* e *Brucella abortus* em cães criados no estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, n.34, p. 69-76, 2000.

CAVALCANTI, L. A.; DASSO, M. G.; OLIVEIRA, F. C. S.; VIEGAS, S. A. R. A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALCANTARA, A. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; OLIVEIRA, E. M. D. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.

CBKC. Confederação Brasileira de Cinofilia. Disponível em: [http:// www.cbkc.org/](http://www.cbkc.org/). Acesso em 20/02/2018.

CHÁCON-DÍAZ, C.; ALTAMIRO-SILVA, P.; GONZÁLEZ-ESPINOZA, G.; MEDINA, M. C.; ALFARO-ALRCÓN, A.; BOUZA-MORA, L.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; WONG, M.; BARQUERO-CALVO, E.; ROJAS, N.; GUZMÁN-VERRI, C.; MORENO, E.; CHAVESOLARTE, E. *Brucella canis* is an intracellular pathogen inducing a lower proinflammatory response than smooth counterparts. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p. 4861-4870, 2015.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37-46, 1960.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CORBEL, M. J.; BANAI, M. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Garrity, GM, editor. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2: The Proteobacteria: Part B. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 2005, p. 377-88.

DEBEAUMONT, C.; FALCONNET, P. A.; MAURIN, M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, p. 842–845, 2005.

DELPINO, M. V.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-Proteobacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n. 5, p. 868–873, 2004

DORNELES, S. E. M.; SANTOS, H.; MINHARRO, S.; NASCIMENTO-ROCHA, J. M.; MATHIS, L. A.; DASSO, M. G.; TIENSOLI, C. D.; HEINNEMAN, M. B.; LAGE, A. P. Anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães de Araguaína, Tocantins. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 167-171, 2011.

DREER, M. K. P.; GONÇALVES, D. D.; CAETANO, I. C. S.; GERONIMO, E.; MENEGAS, P. H.; BERGO, D.; MORI, F. M. R. L.; BENITEZ, A.; FREITA, J. C.; EVERS, F.; NAVARRO, I. T.; MARTINS, L. A. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, 2013.

EISENBERG, T.; HAMANN, H. P.; KAIM, U.; SCHLEZ, K.; SEEGER, H.; SCHAUERTE, N.; MELZER, F.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C.; KOYLASSE, M. S.; WHATMOREE, A. M.; ZSCHÖCKA, M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3753–3755, 2012.

EISENBERG, T.; RIßE, K.; SCHAUERTE, N.; GEIGER, C.; BLOM, J.; SCHOLZ, H. C. Isolation of a novel “atypical” *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 2, p. 221–234, 2017.

ERLICH, H A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science (New York, N.Y)**, v. 252, n. 5013, p. 1643–51, 1991.

FCI. Fédération Cynologique Internationale. Disponível em: <http://www.fci.be/en/>. Acesso em: 20/02/2018

FERNANDES, A. R. F.; AZEVES, S. S.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; GENOVEZ, M. E.; AZEVEDO, A. S.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1405-1408, 2011.

FERNANDES, A. R. F.; FERNANDES, A. G.; ROTONDANO, T. E. F.; ALVES, C. J.; KIM, P. C. P.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S. Inquérito sorológico e molecular da brucelose canina no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1629-1635, 2013.

FERREIRA T.; MANDELBAUM, M. A.; MARQUES, A. P. L.; TORRES, H. M.; FIGUEIREDO, M. J.; SERRA, C. M. B.; AQUINO, M. H. C. Inquérito sorológico da brucelose canina através da utilização de antígeno externo e interno de *Brucella*

canis e *Brucella ovis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 167-168, 2007.

FISCHER, D.; LORENZ, N.; HEUSER, W.; KÄMPFER, P.; SCHOLZ, H. C.; LIERZ, M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, p. 625–628, 2012.

FLORES-CASTRO, R.; CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis* infection in dogs: treatment trials. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 23, p. 75-79, 1981.

FLORES-CASTRO, R.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. **The Cornell Veterinarian**, v. 68, p. 76-88, 1978.

FLORES-CASTRO, R.; SEGURA, R. A Serological and Bacteriological Survey of Canine Brucellosis in Mexico. **The Cornell Veterinarian**, v. 66, p. 347-352, 1976.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688-93, 2007.

FRANCI, P.; DOTTO, G.; CATTAL, A.; PASOTTO, D. Lethal septic shock after dental scaling in a healthy dog due to *Ochrobactrum anthropi*-contaminated propofol. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 5, p. 345-347, 2015.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 905–909, 1974.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. **The Cornell Veterinarian**, v. 68, n. 4, p. 530–43, 1978.

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

GODOY, A. M.; NEVES, J.; PERES, J. N.; BARG, L. Human Laboratory Infection with *Brucella canis*. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 31, n. 1, p. 31-34, 1979.

GOMES, A. S. *Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS)*. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. 441p.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; SOARES, H. C.; BASTOS, C. D.; CANTO, S. P.; BRUM, M.; ROSSI, A. C.; COBERLLINI, L. G. *Brucella canis*: isolamento em um cão com epididimite e orquite – Relato de Caso. São Paulo, **Revista Clínica Veterinária**, n. 18, p. 17-20, 1999.

GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis. In: GREENE CE, (Ed). Infectious diseases of the Dog and Cat. 4.ed. St Louis (MO): **Saunders Elsevier**; 2011. p. 398–410.

GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cat**. 4.ed. Missouri: Saunders, 2012, p. 398-411.

GYURANECZ, M.; SZEREDI, L.; RONAI, Z.; DENES, B.; DENCISO, L.; DAN, A.; PALMAI, N.; HAUSER, Z.; LAMI, E.; MAKRAI, L. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 143-147, 2011.

GWIDA, M.; EL-ASHKER, M.; MELZER, F.; EL-DIASTY, M.; EL-BESKAWY, M.; NEUBAUER, H. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. **Irish Veterinary Journal**, v. 69, n. 3, 2016.

HALL, J. A. BioEdit: a user-friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALL, W. H.; MANION, R. E. In vitro susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. **Applied Microbiology**, p. 20, p. 600-604, 1970.

HALLING, S. M.; TATUM, F. M.; BRICKER, B. J. Sequence and characterization of na insertion sequence, *IS711*, from *Brucella ovis*. **Gene**, v. 133, p. 123-127, 1993.

HALLING, S. M.; ZEHR, E. S. Polymorphism in *Brucella* spp. Due to highly repeated DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6637-6640, 1990.

HÄNSEL, C.; MERTENS, K.; ELSCHNER, M. C.; MELZER, F. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*. **Veterinary Record Open**, v. 2, n. 1, 2015.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, n.10, p. 986-994, 1996.

HILL, W. A.; HOOSIER, G. L.; WENDE, R. D. Epidemic Brucellosis in Beagles. **Journal of infectious Diseases**, Chicago, v. 124, n. 6, p. 615-618, 1971.

HINIĆ, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIĆ, Z.; MAKAYA, P. V.; FREY, J.; ABRIL, C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 375-378, 2008.

HINIĆ, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; HOLUB, M.; MISEREZ, R.; ABRI, C. *IS711*-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 1-8, 2009.

HOFER, E.; BAG, Z. N.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; MELZER, F.; TOMASO, H.; LÓPEZ-GOÑI, I.; FASCHING, G.; SCHMOLL, F. First detection of *Brucella canis*

infections in a breeding kennel in Austria. **New Microbiologica**, v. 35, p. 507–510, 2012.

HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, p. 575–577, 2006.

HOLST, B. S.; LÖFQVIST, K.; ERNHOLM, L., ELD, K.; CEDERSMYG, M.; HALLGREN, G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 18, 2012.

HUDDLESON, I. F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. **Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**. v. 100, p. 1-16, 1929.

HUGHES, M. L. The natural history of certain fevers occurring in the Mediterranean. **Mediterranean Nature**, v. 2, p. 325-327, 1893.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>. Acesso em: 24/01/2018.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols a guide to methods and application**. eds, Academic: Press, New York, 1990, p. 3-12.

JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical Signs and Diagnosis of *Brucella canis* Infection. The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian. **Small Animal**, v. 14, n. 6, p. 763-772, 1992.

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

JONES, L. M.; ZANARDI, M.; LEONG, D.; WILSON, J. B. Taxonomic position in the genus *Brucella* of the causative agent of canine abortion. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 2, p. 625-30, 1968.

KADEN, R.; FERRARI, S.; ALM, E.; WAHAB, T. A novel real-time PCR assay for specific detection of *Brucella melitensis*. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 230, 2017.

KANG, S. I.; LEE, S. E.; KIM, J. Y.; LEE, K.; KIM, J. W.; LEE, H. K.; SUNG, S. R.; HEO, Y. R.; JUNG, S. C.; HER, M.; A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p. 237-241, 2014.

KATTAR, M. M.; ZALLOUA, P. A.; ARAJ, G. F.; SAMAHA-KFOURY, J.; SHBAKLO, H.; KANJ, S. S.; KHALIFE, S.; DEEB, M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for

rapid diagnosis of human brucellosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 23–32, 2007.

KAUFFMAN, L. K.; BJORK, J. K.; GALLUP, J. M.; BOGGIATTO, P. M.; BELLAIRE, B. H.; PETERSEN, C. A. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. **Zoonoses Public Health**, v. 61, p. 48–54, 2014.

KEID, L. B.; CHIEBAO, D. P.; BATINGA, M. C. A.; FAITA, T.; DINIZ, J. A.; OLIVEIRA, T. M. F.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 0, p. 1–7, 2017.

KEID, L. B.; DINIZ, J. A.; OLIVEIRA, T. M.; 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, 2015.

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

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, p. 1203–10, 2007a.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v. 68, p. 1260-1270, 2007b.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 22-26, 2009.

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, p. 951-965, 2007c.

KHAMESIPOUR, F.; DOOSTI, A.; RAHIMI, E. Molecular study of Brucellosis in camels by the use of *TaqMan*® real- time PCR. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 62, n. 4, p. 409–421, 2015.

KIM, J. W.; LEE, Y. J.; HAN, M. Y.; BAE, D. H.; JUNG, S. C.; OH, J. S.; HA, G. W.; CHO, B. K. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of

Brucella canis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1103-1107, 2007.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of *primer* design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289-1291, 2007.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The Real-time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1-2, p. 95-125, 2006.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT): manual técnico**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2006. 184 p.

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

LARSSON, M. H. M. A.; LARSSON, C. E.; COSTA, E. O.; GUERRA, J. L.; HAGIWARA, M. Brucelose canina experimental: Estudo Bacteriológico, Sorológico e Anatomopatológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, p. 141–156, 1984.

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

LIMA, J.T.R. **Avaliação de marcadores sorológicos, microbiológicos e moleculares para diagnóstico da brucelose canina**. 2017. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

LINDAHL-RAJALA, E.; HOFFMAN, T.; FRETIN, D.; GODFROID, J.; SATTOROV, N.; BOQVIST, S.; LUNDKVIST, A.; MAGNUSSON, U. Detection and characterization of *Brucella* spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 11, n. 3, 2017.

LUCERO, N. E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M. N.; REYNES, E.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; AYALA, S. M. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. **Epidemiology Infection**, v. 138, p. 280-5, 2010a.

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

LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; LOPEZ, G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 656-660, 2002.

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

LUCERO, N. E.; MALDONADO, P. I.; KAUFMAN, S.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; JACOB, N. R. *Brucella canis* causing infection in an HIV-infected patient. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 527-9, 2010b.

MACHADO, M. A.; SOLER, N. B.; FREITAS, J. C. Porcentagem de cães soropositivos para *Brucella canis* apresentando problemas reprodutivos atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 3, p. 161-168, 2013.

MAIA, G. R.; ROSSI, C. R. S.; ABRADIA, F. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói-RJ. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 425-427, 1999.

MAKLOSKI, C. L. Canine Brucellosis Management. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 41, p. 1209-1219, 2011.

MALEK DOS REIS, C. B.; HOFFMANN, R. C.; SANTOS, R. S.; TURRI, R. J. G.; ORIANI, M. R. G. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães errantes da cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo, Brasil (2002-2003). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 32-34, 2008.

MANCILLA, M.; ULLOA, M.; GOÑI-LÓPEZ, I.; MORIYÓN, I.; ZÁRRAGA, A. M. Identification of new *IS711* insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 167, p. 1-6, 2011.

MANIAS, V.; NAGEL, A.; MOLLERACH, A.; MENSOSA, M. A.; FREYRE, H.; GÓMEZ, A.; FERRARA, E.; VAY, C.; DE LOS, A.; MÉNDEZ, E. *Brucella canis* endocarditis: first documented case in Argentina. **Revista Argentina Microbiología**, v. 45, n. 1, p. 50-3, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 21 fevereiro 2018.

MARZETTI, S.; CARRANZA, C.; RONCALLO, M.; ESCOBAR, G. I.; LUCERO, N. E. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 55-61, 2013.

MATEU, A. E. M.; MARTIN, M. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 1995.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MORAES, C. C. G.; JÚNIOR NARDI, G.; PAES, A. C.; PRESTES, N. C.; LISTONI, F. J. P. Brucelose Canina: Relato de Caso. São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 4, p. 103-106, 2002.

MEGID, J.; SALGADO, V. R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; MEIRELLES, C. E.; MORETTI, D. M. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007.

MEYER, K. F.; SHAW, E. B. Comparison of morphologic, cultural and biochemical characteristics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Studies on genus *Brucella* Nov. Gen. 1. **Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 173-184, 1920.

MINHARRO, S.; PINTO, A.; LEITE, K. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3-4, p. 167–173, 2005.

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

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

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-61, 1990.

MYERS, D. M.; VARELA-DÍAZ, V. M.; COLTORTI, E. A. Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. **Applied microbiology**, v. 28, n. 1, p.1-4, 1974.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M. J.; SOLERA, J. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231-250, 2015.

NORMAN, S. A.; DELANEY, M. A.; HAMAN, K. H.; THOMAS, A. C.; GODFROID, J.; LARSEN, A. K.; NYMO, I. H.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; QUANCE, C.; RHYAN, J. C.; LAMBOURN, D. M.; JEFFRIES, S. J.; RABINOWITZ, P. Application of real-time quantitative PCR assays for detecting marine *Brucella* spp. in fish. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 1, p. 150-154, 2018.

OIE (World Organisation for Animal Health). Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. Artigo de revisão: brucelose em búfalos (in Portuguese, with English abstract). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 75, p. 389–401, 2008.

PAZ, G. S.; ROCHA, K. S.; LIMA, M. S.; JORGE, E. M.; PANTOJA, J. C. F.; MORAES, C. C. G.; LANGONI, H. Seroprevalence for brucellosis and leptospirosis in dogs from Belém and Castanhal, State of Pará, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 265-270, 2015.

- PICKERILL, P. A. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 1, p. 741-2, 1970.
- PICKERILL, P. A.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 160, n. 12, p. 1607-1615, 1972.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.55-62, 2002.
- 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. 2386-2387, 2011.
- RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 2, p. 6409-6412, 1990.
- RITTO, C; ALVARENGA, B. A casa agora é dos cães e não das crianças. Revista Veja. 2015. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/entretenimento/a-casa-agora-e-dos-caes-e-nao-das-criancas/>> Acesso em: 24/01/2018.
- ROCCA, M. P. **Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil.** 2014. 90f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ROXO, E.; PINHEIRO, S. R.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, J. A.; GOUVÊA, G.; PIORUS, M. L.; LIMA, M. A. B. Brucelose canina: relato de uma possível transmissão de *Brucella canis* ao homem a partir de uma cadela da raça Doberman. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 55, n. 19, p. 11-13, 1990.
- SANCHEZ SARMIENTO, A. ***Brucella* spp. in aquatic mammals of Brazil: serological, molecular, histopathological and immunohistochemical investigation.** 2018. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3 rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.
- SANTANA, J. A.; DORNELES, E. M. S.; JAYME, V. S.; GALVÃO, S. R.; MINHARRO, S.; SANTOS, H.; MATHIAS, L. A.; DASSO, M. G.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Risk factors and presence of antibodies to *Brucella canis* and smooth *Brucella* in dogs from the municipality of Araguaína, Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2951-2956, 2013.
- SCHMIDT, J.; WEIS, F. Bakterierne Naturhistorik Grandlag for det Bakteriologiske Stodium. Copenhagen: **Morten Potsild**, 1901.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375-82, 2008.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p.801–808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; AL DAHOUK, S.; HAMMERL, J. A.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; VERGNAUD, G.; WITTE, A.; AISTLEITNER, K.; HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 2090–2098, 2016.

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

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

SILVA, C. P. A. E.; ALMEIDA, A. B. P. F.; GODOY, I.; ARAÚJO, A. C. P.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Detecção molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1051-1056, 2012.

SOHRABI, M.; MOHABATI MOBAREZ, A.; KHORAMABADI, N.; HOSSEINI DOUST, R.; BEHMANESH, M. Efficient diagnosis and treatment follow-up of human brucellosis by a novel quantitative *TaqMan* real-time PCR assay: a human clinical survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 4239-4243, 2014.

SOLA, M. C.; VEIGA JARDIM, E. A. G.; FEITAS, M. R.; MESQUITA, A. J. Real-time PCR detection of *Brucella* spp. DNA in lesions and viscera of bovine carcasses. **Journal of Microbiological Methods**, v.104, p.87-91, 2014.

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

STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 947–951, 1957.

SURUCUOGLU, S.; EL, S.; URAL, S.; GAZI, H.; KURUTEPE, S.; TASKIRAN, P.; YURTSEVER, S. G. Evaluation of real time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. **Polish Journal of Microbiology**. v. 58, n. 1, p. 15-19, 2009.

TEYSSIER, C.; MARCHANDIN, H.; MASNOU, J. A.; DUSART, G.; JUMAS-BILAK, E. *Ochrobactrum pseudointermedium* sp. Nov., a novel member of the Family Brucellaceae, isolated from human clinical samples. **International journal of systematic evoluinary microbiology**, v.57, p.2513–2518, 2007.

TERAKADO N, UEDA H, SUGAWARA H, ISAYAMA Y, KOYAMA N. Drug susceptibility of *Brucella canis* isolated from dogs. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, p. 291–5, 1978.

TILLER, R. V.; GEE, J. E.; FRACE, M. A.; TAYLOR, T. K.; SETUBAL, J. C.; HOFFMASTER, A. R.; DE B. K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5837–5845, 2010a.

TILLER, R. V.; GEE, J. E.; LONSWAY, D. R.; GRIBBLE, S.; BELL, S. C.; JENNISON, A. V.; BATES, J.; COULTER, C.; HOFFMASTER, A. R.; DE BK. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 23, 2010b.

TRAUM, J. Annual Report to the Chief of the Bureau of Animal Industry, Year Ending June 30, 1914. USDA Bureau of Animal Industry, p. 30.

UÇAN, U. S.; ARAS, Z.; ZORLUTUNA, M. Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using *Rhizobium tropici* as antigen. **Revue de Médecine Vétérinaire Toulouse**, v. 161, p. 51–56, 2010.

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

VASCONCELOS, R. T. J.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; ASRAÚJO NETO, J. O.; ALVES, F. A. L.; BATISTA, C. S. A.; BERNARDI, F.; SOTO, F. R. M.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 436-42, 2008.

VILLALOBOS-VINDAS JM, AMUY E, BARQUERO-CALVO E, ROJAS N, CHACÓN-DÍAZ C, CHAVES-OLARTE E, GUZMAN-VERRI C, MORENO E. Brucellosis caused by the wood rat pathogen *Brucella neotomae*: two case reports. **Journal of Medical Case Report**, v.19, n.1, p.352, 2017.

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, p. 146-148, 2004.

WANKE, M. M. Canine Brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 83, p. 195-207, 2004.

WANKE, M. M.; CAIRÓ, F.; ROSSANO, M.; LAIÑO, M.; BALDI, P. C.; MONACHESI, M. E.; COMERCIO, E. A.; VIVOT, M. M. Preliminary study of an immunochromatography test for serological diagnosis of canine brucellosis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 370-372, 2012.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 367-75, 2002.

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

WARETH, G.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; NEUBAUER, H.; ROESLER, U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, p. 1339-1343, 2014.

WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, Q.; SCHOLZ, H. C.; DICK JR, E. J.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 4120–4128, 2014.

WATSON, R. The formation of artifacts in polymerase chain reaction. **Amplifications**, v. 2, p. 5–6, 1989.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.

YING, W.; NGUYEN, M. Q.; JAHRE, J. A. *Brucella canis* endocarditis: case report. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 1593-1594, 1999.

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

ANEXO – Resultados dos testes de hemocultura, reação em cadeia pela polimerase convencional, reação em cadeia pela polimerase em tempo real e ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico da brucelose canina

Continua

Cão	Origem	Sexo	EIC	Hemo	PCRc	PCRtr- B 54	PCRtr- B 59	PCRtr- B' 59	Sinais clínicos
227/15	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	0
228/15	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	nr	nr	0
229/15	companhia não reprodutor	F	0	0	0	nr	0	nr	0
272/15	companhia não reprodutor	M	0	0	0	0	nr	nr	0
60/15	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	0
098/16	companhia não reprodutor	M	1	1	1	1	1	nr	1
125/17	companhia não reprodutor	M	0	0	0	0	nr	nr	1
141/17	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	1
158/16	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	0
159/16	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	0
160/16	companhia não reprodutor	F	0	0	0	0	0	nr	0
161/16	companhia não reprodutor	M	0	0	0	0	1	nr	1
97/16	companhia não reprodutor	M	0	0	0	nr	nr	0	0
69/16	companhia não reprodutor	M	0	0	0	nr	1	nr	0
231/15	canil 1 (não infectado)	F	0	0	0	nr	nr	0	0
232/15	canil 1 (não infectado)	F	0	0	0	nr	nr	0	0
233/15	canil 1 (não infectado)	M	0	0	0	nr	nr	0	0
234/15	canil 1 (não infectado)	M	0	0	0	nr	nr	1	0
235/15	canil 1 (não infectado)	F	0	0	0	nr	nr	0	0
02/17	canil 2 (foco)	F	0	0	0	0	0	nr	0
03/17	canil 2 (foco)	F	0	0	0	0	0	nr	0
04/17	canil 2 (foco)	F	0	1	1	0	1	nr	0
05/17	canil 2 (foco)	F	1	1	0	0	nr	nr	1
06/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	1	1	nr	1
07/17	canil 2 (foco)	M	1	1	1	1	1	nr	1
08/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	1	1	nr	1
09/17	canil 2 (foco)	M	0	0	0	0	nr	nr	1
10/17	canil 2 (foco)	F	0	0	0	0	0	nr	1
12/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	nr	nr	1	1
13/17	canil 2 (foco)	F	1	0	0	0	nr	nr	1
15/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	1	nr	nr	1
16/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	0	nr	nr	1
19/17	canil 2 (foco)	F	1	0	0	0	nr	nr	1
23/17	canil 2 (foco)	F	1	0	1	0	nr	nr	1
26/17	canil 2 (foco)	F	0	0	0	nr	nr	1	0
27/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	1	1	nr	1
32/17	canil 2 (foco)	F	1	1	1	1	1	nr	1

									Conclusão
Cão	Origem	Sexo	EIC	Hemo	PCRc	PCRtr-B 54	PCRtr-B 59	PCRtr-B' 59	Sinais clínicos
35/17	canil 2 (foco)	M	1	1	1	0	1	nr	1
012/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	1	0	nr	nr	0
013/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	0	0	nr	nr	0
014/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	0	0	nr	nr	0
015/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	0	0	1	nr	0
016/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	0	0	nr	nr	0
017/16	canil 3 (suspeito)	M	0	0	0	0	nr	nr	0
018/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	1	nr	0
019/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	nr	nr	0
020/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	0	nr	0
021/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	nr	nr	0
022/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	0	nr	0
023/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	1	nr	0
024/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	nr	nr	0
025/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	0	nr	0
026/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	1	nr	0
027/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	nr	nr	0
028/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	nr	nr	0
029/16	canil 3 (suspeito)	F	0	0	0	0	1	nr	0
Total			14	12	13	7	15	3	19

Fonte: (Diniz, 2018)

Legenda:

M: Macho

F: Fêmea

0: Resultado negativo

1: Resultado positivo

nr: Não realizado

Hemo: Hemocultura

PCRc: Reação em cadeia pela polimerase convencional

PCRtr-B54: Reação em cadeia pela polimerase em tempo real utilizando primers e sondas B realizada à temperatura de *annealing* de 54 °C e com concentração de *primers* de 900 nM

PCRtr-B59: Reação em cadeia pela polimerase em tempo real utilizando primers e sondas B realizada à temperatura de *annealing* de 59 °C e com concentração de *primers* de 900 nM

PCRtr-B59': Reação em cadeia pela polimerase em tempo real utilizando primers e sondas B realizada à temperatura de *annealing* de 59 °C e com concentração de *primers* de 200 nM