NANCI DO ROSÁRIO VIEIRA

**Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)
para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães
naturalmente infectados**

São Paulo
2004

NANCI DO ROSÁRIO VIEIRA

**Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)
para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães
naturalmente infectados**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo
2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1409
FMVZ

Vieira, Nanci do Rosário

Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella spp.* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados / Nanci do Rosário Vieira. - São Paulo : N. R. Vieira, 2004.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Brucelose animal. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Cães.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella spp.* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados", Protocolo nº343/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, utilizando 100 cães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 03/09/2003.

(We certify that the Research "Development of a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Brucella spp* in blood samples of naturally infected dogs" protocol number 343/2003, under the responsibility of Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, utilizing 100 dogs, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in September/03/2003 meeting.

São Paulo, 08 de setembro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: Vieira, Nanci do Rosário

Título: Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A meu pai (*In memorian*), sapateiro que educou seis filhos.
A minha mãe, seus filhos formados são seu orgulho.

Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso,
porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte,
mais feliz quem sabe,
eu só levo a certeza
de que muito pouco eu sei,
eu nada sei.

Conhecer as manhas
e as manhãs,
o sabor das massas
e das maçãs.

É preciso amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.
Penso que cumprir a vida
seja simplesmente
compreender a marcha,
e ir tocando em frente.
Como um velho boiadeiro
levando a boiada,
eu vou tocando os dias
pela longa estrada eu vou,
de estrada eu sou.

Todo mundo ama um dia
todo mundo chora,
um dia a gente chega,
no outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si,
carrega o dom de ser capaz,
e ser feliz.

Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso
porque já chorei demais.
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si,
carrega o dom de ser capaz,
e ser feliz.

(Almir Sater e Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora de Aparecida que sempre guiaram meus passos e aliviaram minhas angústias nesta empreitada.

Aos meus irmãos, obrigada pelos incentivos e longas conversas.

Ao meu marido, amigo, companheiro e cúmplice, obrigada pelo apoio, incentivo e paciência durante este período, sem você ao meu lado, o caminho seria mais penoso.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain por me ter aceitado como estagiária no LABMAS e pelos conselhos dados durante este período de aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, por me ter aceitado como sua orientanda e por me ter apresentado o mundo da pesquisa, seu fascínio e seus desafios.

Aos meus grandes amigos do LABMAS, Alessandra, Letticie, Henrique e Renata pelo apoio durante minha jornada.

A Adriana, amiga, companheira, mestra e irmã por me ter guiado no fascinante mundo da Biologia Molecular.

A Lara que gentilmente me ajudou a realizar este trabalho, toda minha admiração e gratidão.

A Dr^a Maria Virginia Rubin de Celis, Secretária da Saúde de Vargem Grande Paulista, pelo apoio e paciência nas minhas ausências para assistir as aulas no cumprimento dos créditos.

Aos meus amigos da Vigilância Sanitária de Vargem Grande Paulista, pelo apoio e companheirismo no período difícil de disciplinas, bancada e cumprimento do dever no trabalho.

Aos meus amigos e Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, obrigada pela amizade e pelo constante aprendizado.

A(o)s secretária(o)s Virginia, Cristina, Danival e Tânia, pelo coleguismo, profissionalismo e boas festas.

A equipe da Biblioteca da FMVZ-USP, pela maneira cordial, atenciosa e por todo o carinho com que nos trata.

Aos meus animais de estimação Tainá, Escovinha, Otávia e D'Artagnan, obrigada pela paciência e carinho, mesmo pelo pouco tempo que tive para estar junto a vocês.

A você Leléu (*In memorian*), gato lindo, meigo e companheiro, obrigada por você ter existido.

RESUMO

VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados.** [Development of a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Brucella* spp. in whole-blood samples from naturally infected dogs]. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foram desenhados três pares de *primers*, sendo um deles dirigido ao gene que codifica uma proteína periplasmática da *Brucella* (BP26) e dois outros dirigidos para a região interespaçadora entre os gene 16S e 23S do RNA ribossômico (ITS). Com os *primers* acima, foram padronizadas três PCRs, potencialmente capazes de detectar qualquer espécie de *Brucella* e denominadas PCR-ITS1, PCR-ITS2 e PCR-BP26. Soluções de DNA de sangue de cão livre de *Brucella* foram contaminadas com quantidades decrescentes de DNA de *B. canis* (RM6/66) e, então, submetidas às PCRs descritas anteriormente. Para a avaliação das PCRs quanto à capacidade de detecção de *Brucella* spp. em sangue de animais naturalmente infectados, foram utilizadas 75 amostras de sangue de cães provenientes de canis comerciais onde foram registrados casos clínicos sugestivos de infecção por *Brucella*. As 75 amostras de sangue de cães foram colhidas com anti-coagulante (citrato de sódio) por punção da veia jugular. As amostras foram separadas em duas alíquotas, uma das quais (2 ml) foi submetida ao isolamento e identificação bacteriológica e a outra alíquota (1ml), às PCRs. O DNA total das amostras de sangue foi extraído por método baseado em digestão com proteinase K, SDS e CTAB seguido de purificação com fenol e clorofórmio. Considerando os resultados da PCR de melhor desempenho (PCR-ITS1), entre as 35 amostras positivas pelo isolamento bacteriano, 30 (85,71%) foram positivas pela técnica de PCR, enquanto entre as 40 amostras negativas pelo cultivo bacteriológico, 11 (27,5%) foram positivas pela PCR. A PCR-ITS1 foi capaz de detectar um mínimo de 3,78fg de DNA bacteriano misturado a 450ng de DNA de cão, o que representa, teoricamente, a massa genômica de 1,26 bactérias. Pela aparente superior capacidade de classificar animais positivos que o método de cultura bacteriológica, a PCR-ITS1 parece ser uma técnica promissora para o diagnóstico direto da brucelose em cães.

Palavras-chave: Brucelose animal. Reação em cadeia de polimerase. Cães. Diagnóstico.

ABSTRACT

VIEIRA, N. R. **Development of a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Brucella* spp. in whole-blood samples from naturally infected dogs.** [Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados] 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Three pair of primers were designed against *Brucella* genetic sequences. Two of them were directed to 16S-23S rRNA interspacer and the other was directed to a periplasmatic protein coding gene (BP26). Three PCRs assays named PCR-ITS1, PCR-ITS2 and PCR-BP26, each one putatively capable of amplifying DNA from any *Brucella* species were tested using the aforementioned primers. Nucleic acid extracts from whole-blood from naïve dogs were spiked with decreasing amounts of *B. canis* (RM6/66) DNA and the resulting solutions were tested by PCR. The capability of the PCRs to amplify *Brucella* spp. genetic sequences from naturally infected dogs was evaluated by using 75 whole-blood samples from dogs raised in commercial kennels where clinically affected animals have already been detected with signs suggestive of *Brucella* infection. The whole-blood samples were collected with sodium citrate as anti-coagulant by venal puncturing the jugular vein. The samples were split into two aliquots, one of them (2mL) being submitted to bacterial isolation and identification and the remaining sample (1mL) to PCR. The DNA from whole-blood was extracted by using proteinaseK, SDS and CTAB following phenol-chloroform purification. Considering the results from the PCR with the best performance (PCR-ITS1), within 35 isolation positive samples, 30 were positive by PCR. Within 40 isolation negative samples, 11 were positive by PCR. PCR-ITS1 was capable of detecting as few as 3.78fg of bacterial DNA mixed to 450ng of host DNA. Theoretically, 3.78fg of *Brucella* DNA represents the total genomic mass of 1.26 bacterial cells. The superior ability of PCR-ITS1 on classifying positive animals suggest that PCR-ITS1 is a promising tool for the direct detection of canine brucellosis.

Key-words: Animal brucellosis. Polymerase chain reaction. Dogs. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 -	Amostras de referências do gênero <i>Brucella</i> , identificadas pela espécie, biovar e estirpe. São Paulo - 2004.....	46
Tabela 2 -	Resultados das mensurações de DNA e resultados das diferentes PCRs nas amostras de DNA de sangue de cães positivas pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	63
Tabela 3 -	Resultados das mensurações de DNA e resultados das diferentes PCRs nas amostras de DNA de sangue de cães negativas pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	64
Tabela 4 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes de sangue de cães pela PCR-ITS1 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	69
Tabela 5 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes de sangue de cães pela PCR-ITS2 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	69
Tabela 6 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes de sangue de cães pela PCR- BP26 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	70
Tabela 7 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes de sangue de cães pela PCR- ITS1 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	70
Tabela 8 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes de sangue de cães pela PCR- ITS2 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	70

Tabela 9 -	Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes de sangue de cães pela PCR-BP26 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de <i>Brucella</i> spp. São Paulo - 2004.....	70
------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Alinhamento entre as seqüências ITS de <i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> e <i>Ochrobactrum anthropi</i> . São Paulo - 2004.....	54
Figura 2 –	Sensibilidade analítica das PCR-ITS1 e PCR-ITS2 em diluições seriadas em TE. São Paulo - 2004.....	66
Figura 3 -	Sensibilidade analítica da PCR-BP26 em diluições seriadas em TE. São Paulo - 2004.....	67
Figura 4 -	Sensibilidade analítica da PCR-ITS1.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT = antígeno acidificado tamponado

Ala = aminoácido alanina

CTAB = hexadecyltrimethylammonium bromide

CFT = teste de fixação de complemento

dATP = desoxi-adenosina trifosfato

dCTP = desoxi-citosina trifosfato

dGTP = desoxi-guanosina trifosfato

dTTP = desoxi-timidina trifosfato

DNA = ácido desoxirribonucleico

2-ME = dois mercaptoetanol

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

ELISA = ensaio imunoenzimático

fg = fentograma

g = grama

xg = múltiplos da gravidade terrestre

H₂S = sulfeto de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

IDGA = imunodifusão em gel de ágar

IDGA-ME = imunodifusão em gel de ágar com soro tratado pelo 2-mercaptoetanol

IgG = imunoglobulina G

IgM = imunoglobulina M

Ile = aminoácido isoleucina

ITS = elemento espaçador entre as seqüências codificadoras das unidades ribossômicas 16S e 23S

kDa = kilodalton

M = molar (mol por litro)

ME = 2-mercaptoetanol

Met = aminoácido metionina

mg = miligrama

MgCl₂ = cloreto de magnésio

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

µg = micrograma

µL = microlitro

NaCl = Cloreto de sódio

nm = nanômetro

p/v = peso por volume

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia pela polimerase

PCR-ITS1 = PCR utilizando o par de *primer* ITS1

PCR-ITS2 = PCR utilizando o par de *primer* ITS2

PCR-BP26 = PCR utilizando o par de *primer* BP26

pg = picograma

pH = potencial hidrogeniônico

RFC = prova de reação de fixação de complemento

RNA = ácido ribonucléico

RNAr = ácido ribonucléico ribossômico

RNA_t = ácido ribonucléico transportador

rpm = rotações por minuto

RSAT = prova de soroaglutinação rápida

SAL = prova de soroaglutinação lenta

SAR = prova de soroaglutinação rápida

Ta°C = temperatura de *annealing*

Taq = *Thermus aquaticus*

TAT = prova de soroaglutinação lenta

TBE = tris-borato-EDTA

TE = tampão Tris-EDTA

TRIS = Tris (hidroximetil) amino metano

Tris HCl = Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico

Tris-borato = Tris (hidroximetil) amino metano com borato

UFC = unidade formadora de colônia

V = volts

v/v = volume por volume

X = vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

% = Porcentagem

°C = graus Celsius

α = alfa

+ = positivo

- = negativo

> = maior que

= igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	Sobre o gênero <i>Brucella</i> e a brucelose em animais domésticos...	22
2.2	A brucelose em cães.....	25
2.3	A <i>Brucella canis</i> em Saúde Pública.....	29
2.4	Patogenia da <i>Brucella canis</i>	31
2.5	Diagnóstico da Brucelose canina.....	34
3	OBJETIVOS.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODO.....	45
4.1	Amostras.....	45
4.1.1	Amostra padrão de <i>Brucella</i>	45
4.1.2	Amostras de sangue de cães livres da infecção por <i>Brucella</i> spp.....	46
4.1.3	Amostras de sangue de cães de condição desconhecida quanto à infecção por <i>Brucella</i> spp. (amostras de campo).....	47
4.2	Isolamento e identificação bacteriana.....	47
4.2.1	Isolamento em meio de cultura.....	47
4.2.2	Características Morfológicas.....	48
4.2.3	Características Bioquímicas.....	48
4.3	Extração de ácidos nucleicos.....	49
4.3.1	Extração do DNA de bactérias oriundas de cultura pura.....	49
4.3.2	Extração do DNA a partir de sangue periférico total de cães.....	50
4.4	Quantificação de DNA.....	51
4.5	<i>Primers</i>	52
4.6	Determinação da temperatura de <i>annealing</i> (Ta°C) ótima para os diferentes pares de <i>primers</i>	56
4.6.1	Determinação da Ta°C do <i>primer</i> BP26.....	56
4.6.2	Determinação da Ta°C dos <i>primers</i> ITS1 E ITS2.....	57
4.7	Determinação da sensibilidade analítica das PCRs utilizando os <i>primers</i> BP26, ITS1 E ITS2.....	58
4.7.1	Sensibilidade analítica em TE.....	58

4.7.2	Sensibilidade analítica em sangue experimentalmente contaminado.....	59
4.8	Amplificação das amostras-padrão.....	59
4.9	Amplificação das amostras de campo.....	60
4.10	Análise do produto amplificado.....	60
4.11	Análises estatísticas.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Resultado do isolamento e identificação bacteriana em amostras de sangue.....	62
5.2	Determinação da temperatura de <i>annealing</i> (Ta°C) ótima.....	65
5.3	Determinação da sensibilidade analítica das PCRs utilizando os primers BP26, ITS1 e ITS2.....	65
5.3.1	Sensibilidade analítica em TE.....	65
5.3.2	Sensibilidade analítica em sangue contaminado.....	67
5.4	Amplificação das amostras padrão.....	68
5.5	Amplificação das amostras de campo.....	68
5.6	Análises estatísticas.....	71
6	DISCUSSÃO.....	72
7	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

No gênero *Brucella* são reconhecidas seis espécies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis* (ACHA; SZYFRES, 2001; AL DAHOUK et al., 2003; ALTON et al., 1988; BRICKER, 2002;). Porém o número de espécies descritas neste gênero poderá aumentar com as recentes descrições de *Brucella* em diversas espécies de mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2002).

Os membros desse gênero são bactérias Gram-negativas, em forma de cocobastonetes, desprovidas de cápsula, imóveis, não esporuladas, aeróbias ou microaerófilas e intracelulares facultativas (AL DAHOUK et al., 2003; ALTON et al., 1988; HIPÓLITO et al., 1965; QUINN et al., 1994;).

A brucelose, doença infecciosa associada a infecções por bactérias do gênero *Brucella*, encontra-se disseminada em quase todas as áreas geográficas do mundo, podendo acometer seres humanos e diversas espécies animais, domésticas e silvestres (ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002; NAVARRO et al., 2002; QUINN et al., 1994).

Pelo seu caráter zoonótico, torna-se de primordial importância a identificação das fontes de infecção, a fim de orientar a tomada de decisão para o bloqueio da transmissão ao ser humano e a outros animais susceptíveis (ACHA; SZYFRES, 2001).

Para o diagnóstico laboratorial da brucelose são utilizados métodos diretos e indiretos (OIE, 2000). O método direto mais comumente empregado é o isolamento e posterior identificação do agente por observação de características morfológicas e metabólicas, sorotipagem e fagotipagem. Os métodos diretos possuem grande

especificidade pois permitem detectar a presença da bactéria na amostra testada (ALTON et al., 1988).

O isolamento e identificação bacteriológica têm como desvantagem a demora para a obtenção dos resultados, em geral duas semanas, e também a possibilidade de gerar resultados falso-negativos devido à baixa concentração do agente nos materiais examinados, à má conservação das amostras ou à contaminação da amostra por outros microrganismos (ALTON et al., 1988).

Os testes laboratoriais indiretos utilizados para o diagnóstico da brucelose identificam anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados (ALTON et al., 1988) e baseiam-se, em geral, em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa. Dessa maneira, reações inespecíficas podem ser observadas, decorrentes do compartilhamento de epítomos com outros gêneros bacterianos, como *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Francisella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Pasteurella* e *Yersinia* (CARMICHAEL et al., 1984; CORBEL et al., 1984).

Devido ao prolongado período de bacteremia, característico da infecção por *Brucella canis* em cães, os métodos diretos são bastante utilizados para o diagnóstico da brucelose canina (CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990). Nesse sentido, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) pode constituir-se uma alternativa ao isolamento e cultivo bacteriano, pois pode ser concluída em apenas dois dias, prescinde da viabilidade do agente presente na amostra e é menos suscetível aos inconvenientes gerados pela contaminação da amostra durante a colheita (BRICKER, 2002).

Com efeito, desde a década de 1980 a PCR vem sendo empregada para a detecção de *Brucella* em diversas espécies de hospedeiros (BRICKER et al., 1994;

CORTEZ et al., 2001; EWALT; BRICKER, 2000; FEKETE et al., 1990; FOX et al., 1998; HALLING, 1990; KREADER, 1996; LOPAREV et al., 1991; MATAR et al., 1996; MORATA et al., 1998; NAVARRO et al., 2002; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; RIJPENS et al., 1996; ROMERO; LOPEZ-GOÑI, 1999; ROMERO et al., 1995b; VEMULAPALLI et al., 1999; VERGER et al., 1985). Porém, poucas descrições de emprego da PCR no diagnóstico da brucelose em cães vêm sendo registradas.

Keid (2001), comparou procedimentos laboratoriais (imunodifusão em gel de ágar [IDGA], imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol [IDGA-ME], hemocultura, cultivo de sêmen ou *swab* vaginal e PCR de sêmen ou *swab* vaginal) aplicados ao diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis* e verificou que a PCR empregada em amostras de sêmen ou *swab* vaginal pode ser utilizada como método confirmatório no diagnóstico da brucelose.

No trabalho que relatamos a seguir, foram desenhados três pares de *primers*, sendo um deles dirigido ao gene que codifica uma proteína periplasmática da *Brucella* (ROSSETTI et al., 1996), e dois outros que foram desenhados para a região interespaçadora do gene 16S-23S do rRNA de *Brucella*.

Com os *primers* acima, foram padronizadas três PCRs para a detecção de *Brucella* spp. em sangue de animais naturalmente infectados e os seus respectivos desempenhos foram comparados com o desempenho do isolamento e identificação bacteriológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sobre o gênero *Brucella* e a brucelose em animais domésticos

Em 1887, David Bruce isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados ingleses, mortos na Ilha de Malta, denominando-a *Micrococcus melitensis*. Dez anos mais tarde, Bang isolou do útero e membranas fetais oriundas de abortamento de fêmeas bovinas, um microrganismo que foi denominado *Bacillus abortus*. Em 1918, Alice Evans demonstrou que os microrganismos descritos por Bruce e Bang eram muito semelhantes entre si e, por proposta de Meyer em 1920, foi criado, em homenagem à Bruce, o gênero *Brucella*, (BIER, 1990; HIPÓLITO et al., 1965; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Os membros do gênero *Brucella* são bactérias em forma de cocobacilos Gram negativos, desprovidas de cápsula, imóveis, não esporuladas, aeróbias ou microaerófilas (ALTON et al., 1988; HIPÓLITO et al., 1965; QUINN et al., 1994;).

Atualmente, o gênero *Brucella* é constituído por bactérias, intracelulares facultativas, com seis espécies reconhecidas, cada uma delas acometendo um hospedeiro preferencial (ALTON et al., 1988; ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002). As espécies de *Brucella* são identificadas de acordo com o hospedeiro preferencial, com características morfológicas, propriedades metabólicas, sorotipagem e fagotipagem (ALTON et al., 1988).

A Brucelose, enfermidade causada por infecções de bactérias do gênero *Brucella*, é uma importante infecção zoonótica de distribuição mundial sendo

considerada um agravo à Saúde Pública de difícil solução (ACHA; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002; OIE, 2000).

A *Brucella melitensis* é responsável pela brucelose ovina e caprina, sendo considerada a mais patogênica, causando infecções severas em humanos; a *B. abortus* é o principal agente etiológico da brucelose bovina e bubalina; a *B. suis* acomete principalmente os suínos; a *B. ovis* e a *B. canis* são responsáveis, respectivamente, por epididimite em ovinos e pela brucelose canina, enquanto a *B. neotomae* foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida*. Algumas espécies, como *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* são ainda subdivididas em diversos biótipos (ALTON et al., 1988; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Além destas espécies, estirpes de *Brucella* têm sido isoladas de mamíferos marinhos. Tais estirpes possuem características fenotípicas e genotípicas distintas das seis espécies de *Brucella* até então reconhecidas (FOSTER et al., 2002).

No Brasil, o principal agente etiológico da brucelose em bovinos é a *B. abortus*, estando presente em todos os Estados brasileiros e acarretando considerável prejuízo econômico (BRASIL, 1977; BRASIL, 2001; CASTRO, 1982). Infecções por *B. abortus*, comprovadas por levantamentos sorológicos, também foram detectadas em bubalinos (COSTA et al., 1973; SANDOVAL et al., 1976; SANTA ROSA et al., 1961).

A brucelose suína causada pela *B. suis* vem apresentando prevalência decrescente em nosso meio, em decorrência da intensificação e tecnificação da suinocultura brasileira (BRASIL, 2000; GARCIA-CARRILLO, 1987). Apenas o biótipo 1 de *B. suis* foi isolado no Brasil (CALDAS et al., 1963; POESTER, 1977).

Em ovinos e caprinos, a brucelose causada por *B. melitensis* tem pouca importância devido à ausência de relatos deste agente no país. Porém, maior atenção tem sido dispensada à infecção ovina por *B. ovis*, particularmente na região Sul do país onde a ovinocultura é mais desenvolvida. Alguns estudos mais recentes demonstraram alta prevalência da infecção no Brasil (MAGALHÃES-NETO, 2001; MAGALHÃES-NETO; GIL-TURNES, 1996; RAMOS et al., 1992).

Os cães domésticos e canídeos selvagens (JOHNSON; WALKER, 1992) são suscetíveis à infecção por *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*, porém a infecção por *B. canis* é de maior importância e tem ocorrência cosmopolita (ACHA; SZYFRES, 2001; NIELSEN; DUNCAN, 1990). No Brasil, infecções por *B. canis* vêm sendo registradas por testes sorológicos e por métodos bacteriológicos, apresentando alta frequência de ocorrência, sobretudo nos grandes centros urbanos (ALMEIDA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2003; CÔRTEZ, 1988; GERMANO et al., 1987; GODOY et al., 1977; KEID et al., 2002; LARSSON; COSTA, 1980; LARSSON et al., 1981; MAGALHÃES-NETO, et al., 1992; MAIA et al., 1999; MEGID et al., 1999; MELO et al., 1997; MOLNÁR et al., 2001; MORAES et al., 2002; SANDOVAL et al., 1976; VARGAS et al., 1996).

De forma geral infecções por *Brucella* ocorrem mais comumente pelo contato direto com animais infectados, por ingestão, inalação e pela via venérea. Microrganismos podem ser eliminados em produtos de abortamento, descargas vaginais, sêmen, urina, leite e outras secreções (ACHA; SZYFRES, 2001; QUINN et al., 1994).

O agente penetra no organismo do hospedeiro pelas mucosas respiratórias, conjuntival, prepucial, vaginal ou orofaringeana, atingindo os linfonodos regionais e sendo posteriormente transportados pelos macrófagos ou outras células

fagocitárias onde se replicam (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990; QUINIM et al., 1994).

Os sinais clínicos decorrentes da infecção por *Brucella* dependem tanto da espécie do patógeno como da espécie do hospedeiro acometido. Em animais, os sinais comumente observados que podem evidenciar infecções por *Brucella* são o abortamento no terço final da gestação, a repetição de cio em fêmeas sadias como também epididimite e orquite nos machos (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CURRIER et al., 1982; JOHNSON; WALKER, 1992).

2.2 A brucelose em cães

Carmichael (1966) em New Jersey, Estados Unidos da América (EUA), observou que cadelas da raça Beagle, provenientes de canis, apresentavam episódios de abortamento entre a quadragésima e quinquagésima semana de gestação e que cães machos apresentavam testículos edemaciados ou atrofiados associados com esterilidade. De tecidos fetais e placentários de vários filhotes abortados, foi isolado um cocobacilo Gram-negativo cujas características de cultivo, bioquímicas e sorológicas indicavam que esse organismo pertenceria ao gênero *Brucella*.

Carmichael e Kenney (1968) cultivaram o organismo isolado do fluido alantóide de abortamentos em cadela da raça Beagle, que foi denominado RM 6/66, e o inocularam em 43 cães da mesma raça, livres da infecção, reproduzindo sintomatologia compatível com aquela causada por infecções por *Brucella*.

No mesmo ano de 1968 Carmichael e Bruner verificam que as características bioquímicas (testes para fermentação de carboidratos, produção de H₂S, hidrólise da uréia, atividade de catalase, redução de nitrato, produção de indol, utilização do citrato, oxidase e sensibilidade a corantes) do organismo causador dos abortamentos caninos eram semelhantes a das brucelas já descritas, propondo o nome de *Brucella canis* para esse novo organismo.

A partir de então, infecções por *Brucella* em cães vêm sendo assinaladas em populações caninas de diversos países.

Fredrickson e Barton (1974) na região metropolitana de Nashville, Tennessee, Estados Unidos da América (EUA) encontraram dez (4,38%) animais positivos em 228 cães, ao utilizarem a técnica de soroaglutinação lenta para diagnóstico de brucelose por *Brucella canis*.

Sandoval et al. (1976) encontraram 3,61% de soropositividade pela prova de soroaglutinação lenta em tubos para *Brucella canis* em 221 cães apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo, Brasil.

Flores-Castro e Segura (1976) examinaram 500 cães, sendo que 300 foram submetidos à prova de soroaglutinação rápida e 200 à prova de soroaglutinação lenta, resultando em 28% de positivos em pelo menos um dos testes empregados. De 140 animais positivos pelo diagnóstico sorológico, oito apresentaram hemocultura positiva.

Godoy et al. (1977) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, realizaram a pesquisa de aglutininas contra *Brucella canis* em 76 cães examinados com as provas de soroaglutinação rápida e lenta. Dentre esses cães, houve uma fêmea com histórico de abortamento, cuja sorologia positiva foi confirmada pelo isolamento de *B. canis* através de hemocultivo.

Galphin (1977) em Columbus, Estados Unidos da América (EUA), examinou 160 cães, domiciliados e errantes, e encontrou 7,6% de animais errantes positivos, nos testes de soroaglutinação rápida e lenta.

Saegusa et al. (1978) na cidade de Tóquio, Japão, através da prova de soroaglutinação lenta, examinaram 945 cães e encontraram 2,9% positivos para *Brucella canis*. Desses 459 cães, 11 foram positivos no diagnóstico bacteriológico.

Boebel et al. (1979) examinaram 2572 amostras de soros de cães provenientes dos estados de Illinois e Wisconsin, EUA, e verificaram que apenas 23,7% das amostras reatoras na soroaglutinação rápida em placa (RSAT), apresentaram títulos iguais ou superiores a 200 na soroaglutinação em tubo (TAT).

Bosu e Prescott (1980) no sudoeste de Ontário, Canadá, realizaram testes sorológicos para *Brucella canis* em 2000 cães e constataram que de 100 reatores na prova de soroaglutinação rápida, houve apenas um confirmado na prova de soroaglutinação lenta e seis na imunodifusão em gel de ágar.

Larsson e Costa (1980) em São Paulo, Brasil, examinaram vinte e sete cães, sendo dezessete provenientes de canis e dez cães errantes. Cinco cães apresentaram reação à soroaglutinação lenta e três foram positivos para *Brucella canis* na hemocultura. Os isolamentos foram obtidos de animais que apresentavam sinais clínicos de brucelose.

Taylor (1980) na Escócia, examinou 169 cães atendidos no Hospital de Veterinário de Glasgow. Foi empregada como teste de triagem uma prova de rosa bengala, utilizando *Brucella ovis* como antígeno, e como teste confirmatório a prova de soroaglutinação lenta. Das 16 amostras positivas ao teste de rosa bengala, apenas duas também foram positivas na soroaglutinação lenta.

Larsson et al. (1981) em São Paulo, Brasil, examinaram 364 cães, sendo 164 de canis e 200 errantes, e verificaram que 9,1% dos animais de criação e 7,5% dos animais errantes eram positivos para o teste de soroaglutinação rápida em placa e que 2,4% dos animais de criação e 7,0% dos animais errantes eram positivos para o teste de soroaglutinação lenta em tubos.

Germano et al. (1987) em Campinas, Brasil, constataram que de 352 cães examinados durante a Campanha Anual de Vacinação Anti-Rábica, 5,4% foram positivos para *Brucella canis* quando do emprego da técnica de soroaglutinação rápida em placa em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol.

Côrtes et al. (1988) em São Paulo, Brasil, encontraram 7,5% de animais reagentes para *Brucella canis*, na prova de imunodifusão em gel de ágar, ao examinarem 3386 cães apreendidos pelo Programa de Controle de Reservatórios de Zoonoses Urbanas pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo, no período de 1981 a 1985.

Pillai et al. (1991) em Madras, Índia, durante o período de 1986-1988, examinaram 640 cães, atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Colégio Veterinário de Madras, através da técnica de soroaglutinação lenta em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol. Houve 18 (2,8%) animais positivos, dos quais cinco confirmados pela hemocultura.

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

Moraes et al. (2002) na microrregião da Serra de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, examinaram 1072 cães e encontraram 1,77% de positivos através da

soroaglutinação rápida e 0,84% através da soroaglutinação rápida em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol.

Azevedo et al. (2003) utilizando as provas de IDGA-ME e CFT como testes confirmatórios, observou que a prevalência de anticorpos contra *B.canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, em São Paulo, Brasil, foi de 2,2% com I.C. 95% igual 1,01 a 4,13%.

Azevedo et al. (2003) observaram a ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em 118 cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil, durante o período de janeiro a março de 2003, através da técnica do antígeno acidificado tamponado (AAT) como prova de triagem e a técnica do 2-mercaptoetanol (2-ME) como teste confirmatório e a soropositividade encontrada foi de 0,85% (1/118).

2.3 A *Brucella canis* em Saúde Pública

A brucelose canina também pode ser considerada um problema de saúde pública já que humanos podem se infectar por *B. canis*, quando em contato com animais infectados (ACHA; SZYFRES, 2001; CARMICHAEL, 1976; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Munford et al. (1975) descreveram dois casos de brucelose causada por *Brucella canis*, em humanos, os quais tinham contato direto com cães cujos testes para brucelose canina foram positivos.

Flores-Castro e Segura (1976) realizaram um estudo na cidade do México e verificaram que 13,3% dos 203 soros humanos testados pelo método de aglutinação em placa apresentavam títulos aglutinantes maiores ou iguais a 100 para *Brucella canis*, porém estes dados foram interpretados com cautela, já que as amostras humanas não foram submetidas ao cultivo bacteriano e os testes usados podem apresentar reações cruzadas com outros agentes bacterianos.

Godoy et al. (1979) descrevem, no estado de Minas Gerais, Brasil, um caso humano de infecção acidental em laboratório, causada por *Brucella canis*, diagnosticado através de hemocultura e soroaglutinação.

Larsson (1986) na cidade de São Paulo, Brasil, examinou 330 soros humanos pela prova de soroaglutinação lenta em tubos sendo que quatro soros (1,21%) apresentaram aglutininas anti *Brucella canis* em diluições 1:100 ou maiores.

No Alabama EUA, Rousseau (1985) descreveu um caso de infecção por *Brucella canis*, de origem desconhecida, numa mulher de 58 anos a qual apresentava títulos aglutinantes para IgG de 640.

Rumley e Chapman (1986) em Mississippi EUA, descrevem um caso de infecção por *Brucella canis* num homem de 48 anos que apresentou títulos aglutinantes de 200 no teste de aglutinação em tubo. A origem da infecção provavelmente foi de sua criação de cães.

Roxo et al. (1990) relatou, na cidade de São Paulo, Brasil, a ocorrência de infecção por *Brucella canis* em uma criança de 14 anos, possivelmente em decorrência do convívio estreito com uma cadela infectada da raça Dobermann.

Magalhães Neto et al. (1992) realizaram um estudo de prevalência em humanos e caninos na cidade de Pelotas no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram

examinados 363 humanos e 304 cães, de maneira que 7,1% e 22,7% foram positivos pela prova de imunodifusão em gel de Agar, respectivamente.

Na Argentina, Wallach et al. (2004) descreveram um caso de brucelose humana num técnico de laboratório causado pela estirpe M- de *Brucella*, considerada menos patogênica para cães. Foram observados resultados positivos na hemocultura e nas provas de soroaglutinação rápida e ELISA. A infecção possivelmente ocorreu por manipulação do agente sem o emprego de equipamentos de proteção laboratoriais.

2.4 Patogenia da *Brucella canis*

A brucelose canina é uma doença sistêmica caracterizada pela ocorrência de bacteremia prolongada, com ausência de febre. A bacteremia pode persistir por dois anos ou mais e, em alguns cães pode ser intermitente (CARMICHAEL et al., 1984; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

A *Brucella canis* penetra no organismo animal através das membranas orofaringeana, ocular, nasal, prepucial e vaginal. O período de incubação é variável, sendo a bacteremia observada entre uma e quatro semanas pós-infecção (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Logo após a penetração no organismo do hospedeiro, as brucelas são englobadas por células fagocitárias nas quais o agente sobrevive e multiplica-se, sendo posteriormente transportadas aos linfonodos regionais. Após infecção dos

linfonodos, as brucelas atingem a circulação sanguínea, ocorrendo bacteremia e disseminação preferencialmente para tecidos ricos em esteróides gonadais e em células reticuloendoteliais, como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, útero de fêmeas gestantes, próstata, epidídimos e testículos (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Nas cadelas infectadas, o abortamento em fase final de gestação (entre 45 e 55 dias), seguido por descarga vaginal prolongada, assim como morte e reabsorção embrionária são os sinais mais comumente observados. Ocorrência de natimortos e o nascimento de filhotes fracos, que morrem dentro de poucas horas ou em poucos dias também foi relatada. As fêmeas infectadas podem apresentar ninhadas subseqüentes normais, após um período de abortamento. Assim, os filhotes sobreviventes podem parecer sadios, mas apresentar aumento do volume dos linfonodos e bacteremia. (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CURRIER et al., 1982; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Nos machos são encontradas lesões como orquites, epididimites, dermatites da bolsa escrotal, atrofia testicular, prostatites e esterilidade (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CURRIER et al., 1982; DEL AMO et al., 1995; GOMES et al., 1999; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE; KAKUK, 1969; NIELSEN; DUNCAN, 1990; SCHOEB; MORTON, 1978).

Além das manifestações em tecidos reprodutivos, sinais e lesões em outros tecidos também são comumente observados, como: linfadenopatia, esplenomegalia (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; CURRIER et al., 1982), discoespondilite, osteomielite (SMEAK et al., 1987) e uveíte anterior (RIEKE;

RHOADES, 1975; SAEGUSA et. al., 1977; SAEGUSA et al., 1978; THOMPSON, 1975). Vale destacar ainda, a possibilidade de ocorrência de animais infectados assintomáticos, comportando-se como importantes fontes de infecção (JOHNSON; WALKER, 1992).

A transmissão do agente ocorre preferencialmente por contato direto com cães infectados, por via oronasal, venérea e congênita (JOHNSON; WALKER, 1992). O agente pode ser eliminado em tecidos de fetos abortados, descarga vaginal (CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; JOHNSON; WALKER, 1992), sêmen (GEORGE et al., 1979; MOORE; KAKUK, 1969) e urina (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979).

O controle e profilaxia da *Brucella canis* em populações de cães envolve alguns procedimentos como a confirmação do diagnóstico através de testes sorológicos e bacteriológicos, quarentena, identificação e eliminação dos animais infectados além da implantação de práticas para a prevenção de futuros surtos (JOHNSON; WALKER, 1992; JONES; EMERSON, 1984; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972).

Nos canis, os animais que saem do plantel para acasalamento só devem ser readmitidos após quarentena e realização de exames sorológicos com resultados negativos. Os animais utilizados para reprodução devem ser re-testados a cada três ou quatro meses após cobertura (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

O único método seguro para a erradicação da brucelose canina em populações confinadas é a identificação e eliminação de animais infectados, uma vez que não há vacina contra a *Brucella canis* (JOHNSON; WALKER, 1992; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972).

2.5 Diagnóstico da Brucelose canina

O diagnóstico da brucelose canina é rotineiramente realizado por meio de testes sorológicos (métodos indiretos) e pelo isolamento e identificação bacteriológica (métodos diretos).

O sorodiagnóstico da infecção por *B. canis* é rotineiramente realizado com as provas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (ALTON et al., 1988; CARMICHAEL et al., 1984; MYERS; VARELA-DIAZ, 1974; ZOHA; CARMICHAEL, 1982), soroaglutinação rápida (SAR) (BADAKHSI et al., 1982; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; GEORGE; CARMICHAEL, 1978) e soroaglutinação lenta (SAL) (ALTON et al., 1988; CARMICHAEL et al., 1984). Todavia, estas técnicas são caracterizadas por baixa especificidade em função da utilização de antígenos de superfície bacteriana, que podem ser comuns a outros gêneros de bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, estirpes mucóides de *Staphylococcus* spp. e *Bordetella bronchiseptica* (CARMICHAEL et al., 1984; MATEU-DE-ANTONIO et al., 1994; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

O emprego do 2-mercaptoetanol como agente de desnaturação de moléculas de IgM pode ser utilizado para aumentar a especificidade das provas de soroaglutinação, porém elevada porcentagem de reações falso-positivas ainda podem ser observadas (CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; ZOHA; CARMICHAEL, 1982), assim como baixa sensibilidade para a detecção de anticorpos durante o período inicial da infecção (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; NIELSEN; DUNCAN, 1990; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Os testes sorológicos atualmente empregados (aglutinação e imunodifusão), são ainda caracterizados por baixa sensibilidade analítica, podendo apresentar resultados falso-negativos, sobretudo na fase inicial da infecção e nas infecções crônicas. Assim, o diagnóstico definitivo da infecção deve basear-se sempre na associação de métodos indiretos com métodos diretos de diagnóstico, como o isolamento bacteriano e a reação em cadeia pela polimerase (KEID, 2001; MELO et al., 1997; WOOLEY et al., 1978).

O isolamento e identificação bacteriana é o método direto mais utilizado para a confirmação dos resultados obtidos com os testes sorológicos (GREENE, 1998; MOORE, 1969; NIELSEN; DUNCAN, 1990), sendo possível detectar o organismo em diversos materiais provenientes de cães infectados, como: sangue (CARMICHAEL et al., 1984; CARMICHAEL; SHIN, 1996; KEID et al., 2002), sêmen (MOORE; GUPTA, 1970), urina (SERIKAWA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979), secreções vaginais (JOHNSON; WALKER, 1992; KEID, 2001) e tecidos (GOMES et al., 1999; MOORE; KAKUK, 1969). O sangue é considerado o material de eleição para o isolamento bacteriano devido ao prolongado período de bacteremia característico da brucelose canina (CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; KEID et al., 2002).

Apesar do cultivo bacteriológico permitir a detecção específica do agente etiológico da brucelose, os métodos de isolamento e identificação bacteriana demandam tempo e impõem riscos decorrentes da manipulação bacteriana (ALTON et al., 1988; GODOY et al., 1979; SEWELL, 1995).

Desde 1987, a PCR vem sendo empregada como instrumento para o aprimoramento do diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e no homem, pela tendência de apresentar-se mais sensível que os métodos

bacteriológicos e mais específica que as técnicas sorológicas atualmente utilizadas no diagnóstico da brucelose (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997).

Considerando sua rapidez de execução em relação ao cultivo bacteriológico, a PCR tem sido uma alternativa promissora ao diagnóstico direto de organismos de crescimento lento ou fastidioso (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997).

A PCR vem sendo empregada com sucesso para a detecção de *Brucella* em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras, como sêmen (AMIN et al., 2001; KEID, 2001; MANTEROLA et al., 2003), secreções vaginais (KEID, 2001), leite (HAMDY; AMIN, 2002; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000;), tecidos (ÇETINKAYA et al., 1999; CORTEZ et al., 2001; GALLIEN et al., 1998; LEYLA et al., 2003), sangue (GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000; MATAR et al., 1996; MORATA et al., 1998; NAVARRO et al., 1999; NAVARRO et al., 2002; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997;), soro (ZERVA et al., 2001) e produtos lácteos (SERPE et al., 1999).

Os primeiros ensaios empregando a PCR para o diagnóstico da brucelose utilizaram-se de *primers* gênero-específico capazes de identificar indistintamente as espécies conhecidas do gênero *Brucella*.

A primeira PCR gênero-específico para detecção de *Brucella* spp. foi realizada com oligonucleotídeos desenhados por Fekete et al. (1990). Nesta PCR, um fragmento de 635pb do gene codificador de uma proteína de membrana de 43 kDa foi amplificado a partir de uma amostra contendo até 0,1pg de DNA de *Brucella*. A especificidade analítica da reação foi aferida utilizando-se 17 microrganismos potencialmente associados a infecções em bovinos, não sendo observado qualquer sinal inespecífico.

Fekete et al. (1992) empregaram o mesmo par de *primers* em uma PCR aplicada sobre amostras de abortamento bovino, encontrando um limiar de detecção de cinco células de *Brucella*/100mg de tecido. Das amostras testadas, 55 foram positivas tanto para a PCR quanto para o cultivo bacteriológico e, de 52 amostras negativas pelo isolamento bacteriano, duas foram positivas pela PCR.

Baily et al. (1992) desenharam os *primers* B4 e B5 que amplificam um fragmento de 223 pares de bases a partir do gene codificador da proteína periplásmica imunogênica denominada BCSP31 e com uma massa molecular de 31 kDa. Este gene é conservado em todas as espécies de *Brucella*. A PCR baseada nos primers B4/B5 foram testadas em culturas puras de *B. melitensis*, *B. abortus* e outras bactérias Gram-negativas utilizando dois métodos de extração de DNA (extração por fervura e extração enzimática por proteinase K e lisozima). A sensibilidade analítica observada foi de 20 bactérias/mL de suspensão bacteriana analisada, não tendo sido observadas reações cruzadas com os outros microrganismos utilizados.

Posteriormente, verificou-se que os primers B4 e B5 amplificam também DNA de *Ochrobactrum anthropi*, uma bactéria cuja infecção associada em seres humanos ocorre com baixa frequência e na maioria das vezes em pacientes imunossuprimidos ou submetidos a cateterismo venoso (CASANAS et al., 2001; CIESLAK et al., 1992; GRANSDEN; EYKYN, 1992; MANFREDI, 1999).

Desde então, a metodologia descrita por BAILY et al. (1992) vem sendo empregada por diversos outros autores com o objetivo de detectar *Brucella* spp. em uma extensa diversidade de substratos de origem biológica, como vísceras, leite e sangue.

Gallien et al. (1998) empregaram a metodologia descrita por BAILY para diagnosticar *Brucella* spp. em 18 amostras de órgãos provenientes de bovinos abatidos emergencialmente, que foram submetidas também ao cultivo bacteriológico, resultando em 18 amostras positivas para a PCR e 13 para o método bacteriológico.

Cortez et al. (1999) utilizando os *primers* B4/B5 e dois protocolos diferentes de extração de DNA (extração por fervura e extração por proteinase K) em amostras de órgãos de produtos de abortamentos de origem bovina observaram concordância satisfatória pelo coeficiente Kappa ($K=0,73$) entre a PCR e o cultivo bacteriológico, assim como uma sensibilidade analítica de 2 UFC/mL e 20 UFC/mL respectivamente pelos protocolos de extração enzimática e fervura. De 61 amostras examinadas, sete foram positivas tanto na PCR quanto no cultivo e de 54 amostras negativas no cultivo, quatro foram positivas pela PCR. Todas as amostras positivas no cultivo bacteriológico também foram positivas pela PCR.

Matar et al. (1996) utilizaram os *primers* B4 e B5 em 50 amostras de sangue humano, sendo 20 provenientes de pacientes infectados e 30 pacientes não infectados por *Brucella* spp., de acordo com dados clínicos e resultados obtidos em exames sorológicos. Não houve amplificação de DNA nas amostras de pacientes não infectados, enquanto que todos os pacientes infectados, foram diagnosticados como positivos pela PCR.

Queipo-Ortuño et al. (1997) utilizaram os mesmos pares de *primers* B4 e B5 para detecção de *Brucella* spp. em 110 amostras de sangue humano. Das 110 amostras, 50 eram procedentes de pacientes com brucelose, diagnosticada por meio de exames sorológicos e bacteriológicos e 60 de humanos não infectados por *Brucella* spp. A PCR apresentou sensibilidade de 100 % e especificidade de 98,3 %.

Empregando os *primers* B4 e B5, Morata et al. (1998) avaliaram a presença de compostos heme bem como a intensidade da concentração de DNA da amostra como possíveis inibidores da PCR em amostras de sangue de pacientes humanos com brucelose. Os autores concluíram que quantidades de DNA maiores que 2 a 4µg por reação de PCR e a presença de hemoglobina podem atuar como fatores inibidores da reação de amplificação.

Com efeito, a PCR utilizando os *primers* B4 e B5 em amostras de soro humano para a detecção de *Brucella* spp. resultou em maior sensibilidade (94%) quando comparada à utilização de amostras de sangue total (61%), possivelmente devido à menor quantidade de inibidores presentes no soro (ZERVA et al., 2001).

Navarro et al. (1999) empregaram a mesma metodologia descrita por Queipo-Ortuño et al. (1997) para a detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue periférico humano, porém, observaram sensibilidade de 50% e especificidade de 60 % relativas ao cultivo bacteriológico.

Os *primers* BRU-UP e BRU-LOW, também específicos para o gene BCSP-31 de *Brucella* foram empregados na PCR para detecção de *Brucella* em 44 amostras de sangue provenientes de búfalos, também testadas pelo cultivo bacteriológico, ELISA (sorodiagnóstico) e reação de fixação de complemento (RFC) (sorodiagnóstico). Das 44 amostras, 13 (29,5%) foram positivas pela PCR. Os resultados da PCR e dos testes sorológicos concordaram em 19 amostras e cinco amostras (11,4%) foram positivas pela PCR e negativas pelo ELISA e pelo RFC. Nenhuma das amostras testadas foi positiva pelo cultivo microbiológico. A sensibilidade analítica da reação foi de $4,2 \times 10^2$ UFC/mL de sangue analisado (GUARINO et al., 2000).

Uma PCR baseada em *primers* específicos (F4 e R2) para o gene codificador da unidade 16S do RNA ribossômico foi capaz de detectar todas as espécies de *Brucella*, com uma sensibilidade analítica de até 80fg de DNA contido no volume de amostra submetido à amplificação. A especificidade analítica da PCR direcionada ao gene 16S rDNA foi determinada com DNA de estirpes de bactérias filogeneticamente relacionadas a *Brucella* bem como com estirpes bacterianas que apresentavam reações cruzadas em provas de identificação sorológica. Um sinal de pouca intensidade foi obtido apenas com o *Ochrobacterium anthropi*, o que não causou estranheza pois o gênero *Ochrobactrum*, pertencente à subdivisão α -2 da classe *Proteobacteria*, é o organismo geneticamente mais próximo da *Brucella* (ROMERO et al., 1995a).

Empregando os *primers* F4 e R2, Romero et al (1995b) compararam a metodologia de PCR descrita por Romero et al. (1995a) com o cultivo bacteriológico em 56 amostras de leite de vacas infectadas por *Brucella* spp. As 56 amostras examinadas foram positivas no cultivo, sendo que 23 foram identificadas como *B. abortus* (10 do biovar 1 e 13 do biovar 3), 31 foram identificadas como *B. melitensis* biovar 3 e duas não puderam ser tipificadas entre espécie e biovar. Das 56 amostras, 49 foram positivas na PCR, com uma sensibilidade analítica de 170 UFC/mL para *B. abortus* e $1,7 \times 10^3$ UFC/mL para *B. melitensis*.

Çetinkaya et al. (1999) utilizaram um par de *primers* derivado da unidade 16S do RNA ribossômico de *B. abortus* em 16 amostras de conteúdo estomacal de fetos bovinos e detectaram DNA de *Brucella* em cinco amostras, das quais quatro foram positivas no cultivo microbiológico. Uma amostra negativa na PCR foi positiva no cultivo. O limiar de detecção obtido foi de aproximadamente 200 bactérias/mL.

Leal-Klevezas et al. (1995) desenharam um par de *primers* (DSR e DSF) a partir do gene *omp2*, codificador de uma proteína de membrana externa que se apresenta em duas cópias quase idênticas no genoma bacteriano (*omp2a* e *omp2b*). Os *primers* foram desenhados em uma região conservada, presente nas duas cópias gênicas, resultando em dois fragmentos, um de 804bp referente ao gene *omp2b* e outro entre 804 e 830bp referente ao *omp2a*. Os primers foram testados em todas as espécies e biótipos conhecidos de *Brucella* (exceto *B. neotomae*) e algumas bactérias filogeneticamente ou sorologicamente relacionadas. No biótipo 1 de *B. abortus*, ao contrário do observado nas outras espécies, o produto referente ao gene *omp2a* apresentou 689bp, devido à deleção de um fragmento de aproximadamente 115bp. Não foram observadas reações cruzadas com as outras bactérias testadas.

Leal-Klevezas et al. (1995) empregaram outros *primers* (JPF e JPR), específicos para o gene *omp2* de *Brucella*, em amostras de sangue e leite bovino e caprino experimentalmente contaminadas com diferentes concentrações de *B. abortus* e *B. melitensis*. Observou-se um único produto amplificado de 193bp e um limiar de detecção inferior a 10 células/mL de leite. A sensibilidade analítica para amostras de sangue não foi determinada. Os *primers* JPF e JPR não permitiram a detecção dos biótipos 2, 3 e 4 de *B. suis*, de *B. canis* e *B. ovis*.

Foram comparadas três diferentes metodologias utilizando a PCR para a detecção de *Brucella* em amostras de sangue humano, empregando os seguintes pares de *primers*: B4/B5 (específico para o gene BCSP-31), F4/R2 (derivados do DNA codificador do RNAr 16S) e JPF/JPR (gene *omp2*). Foram observadas diferenças em relação à sensibilidade analítica na detecção de DNA de *Brucella*, a qual variou entre 8 e 20fg de DNA sendo os *primers* JPF/JPR aquele par cuja PCR teve maior sensibilidade analítica (NAVARRO et al., 2002).

Contrastando com genes codificadores de proteínas estruturais, a maioria dos segmentos do elemento espaçador (ITS) entre os genes codificadores das unidades ribossomais 16S e 23S não estão sujeitos a pressões seletivas intensas, de forma que a variabilidade encontrada em sua seqüência de bases é um evento que pode ser verificado até mesmo entre organismos estreitamente relacionados.

O DNA codificador de RNA ribossômico de procariotos consiste de múltiplas cópias de um conjunto de segmentos que contemplam genes que são transcritos para originar as unidades 16S e 23S, moléculas estruturais dos ribossomos, que compõe, respectivamente, a menor e a maior sub-unidade ribossômico. Neste conjunto de segmentos de DNA, os genes que codificam as unidades 16S e 23S são intercalados por um segmento espaçador denominado ITS (do Inglês, *Internal Transcribed Spacer*) (HILLIS; DIXON, 1991).

De maneira geral, para comparação entre organismos, as seqüências codificadoras das unidades 16S e 23S são utilizadas para elucidar divergências mais antigas que aquelas elucidadas pela análise das seqüências ITS. As seqüências ITSs são caracterizadas por possuírem uma taxa evolutiva muito superior àquelas das unidades codificadoras, sendo por isso utilizadas para revelar divergências entre organismos que ocorreram em períodos muito mais recentes (HILLIS; DIXON, 1991; OLSEN; WOESE, 1993).

Entretanto, o alinhamento da região ITS de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, demonstrou alta similaridade (>99%) entre estas espécies (RIJPENS et al., 1996). Assim, dois pares de *primers* gênero-específico, BRU-P5/BRU-P8 e BRU-P6/BRU-P7, direcionados à região ITS de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* foram usados em nested-PCR, resultando em produtos amplificados de 726bp e 678bp, respectivamente. A especificidade analítica da prova para as duas seqüências de

primers foi avaliada com o emprego da *O. anthropi*. A uma temperatura de *annealing* de 55°C nenhum dos pares de *primers* empregados amplificaram seqüências de *O. anthropi* (RIJPENS et al., 1996).

Já a utilização dos *primers* KF5 e KF6, flanqueadores de ITS e derivados, respectivamente, das regiões 3' terminal de 16S e 5' terminal de 23S resultou na amplificação consistente de cinco bandas (1530bp, 916bp, 701bp, 399bp e 316bp) a partir da amplificação de DNA de todas as estirpes de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis* testadas (FOX et al., 1998). Neste caso, os autores sugeriram que o *operon* ribossômico da *Brucella* pode ser representado por mais de uma cópia, cada uma com diferentes dimensões de ITS.

Porém, a determinação do genoma completo de isolados de *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* revelou que o *operon* ribossômico em brucella ocorre duas vezes no cromossomo maior e uma vez no cromossomo menor. As três cópias do *operon* ribossômico na *Brucella melitensis* são virtualmente idênticas, formadas por uma unidade codificadora da fração 16S, uma região espaçadora contendo genes para RNAt-Ile e RNAt-Ala, uma unidade codificadora da fração 23S, uma segunda região espaçadora sem seqüência codificadora de RNAt, uma unidade codificadora da fração 5S e por fim uma fração contendo gene para RNAt-Met (BRICKER, 2000).

3 OBJETIVOS

1. Desenhar *primers* para PCRs específicas para detecção de bactéria do gênero *Brucella*.
2. Avaliar a sensibilidade analítica das técnicas de PCR em amostras de sangue provenientes de animais livres de infecção, experimentalmente contaminadas com quantidades decrescentes de DNA de *Brucella canis*.
3. Avaliar as técnicas de PCR na detecção de *Brucella* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados, comparando seus desempenhos com o desempenho do isolamento e identificação bacteriológica realizado a partir de alíquotas da mesma amostra.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Amostras

4.1.1 Amostra padrão de *Brucella*

Foram utilizadas seis espécies de *Brucella* e seus respectivos biotipos, totalizando 17 amostras-padrão e uma amostra vacinal (tabela 1). Todas as amostras, com exceção da amostra *B. abortus* B19 (vacinal), foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marisa da Costa, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 1. Amostras de referência do gênero *Brucella*, identificadas pela espécie, biovar e estirpe. São Paulo – 2004

Espécies	Biovar	Estirpe ^a
<i>Brucella abortus</i>	1	544 (ATCC 23448; BCCN R4) ^b
	1	B19 (vacinal)
	2	86/8/59 (ATCC 23449; BCCN R5) ^b
	3	Tulya (ATCC 23450; BCCN R6) ^b
	4	292 (ATCC 23451; BCCN R7) ^b
	5	B3196 (ATCC 23452; BCCN R8) ^b
	6	870 (ATCC 23453; BCCN R9) ^b
	9	C68 (ATCC 23455; BCCN R11) ^b
<i>Brucella canis</i>	-	RM 6-66 (ATCC 23365; BCCN R18) ^b
<i>Brucella melitensis</i>	1	16M (ATCC 23456; BCCN R1) ^b
	2	63/9 (ATCC 23457; BCCN R2) ^b
	3	Ether (ATCC 23458; BCCN R3) ^b
<i>Brucella neotomae</i>	-	5K33 (ATCC 23459; BCCN R16) ^b
<i>Brucella ovis</i>	1	63/290
<i>Brucella suis</i>	1	1330 (ATCC 23444; BCCN R12) ^b
	2	Thomsen (ATCC 23445; BCCN R13) ^b
	3	686 (ATCC 23446; BCCN R14) ^b
	4	40 (ATCC 23447; BCCN R15) ^b

^aATCC, American Type Culture Collection; BCCN, Brucella Culture Collection, Nouzilly, France.

^bEstirpes de referência

4.1.2 Amostras de sangue de cão livre da infecção por *Brucella* spp.

As amostras deste item foram obtidas de cão sorologicamente negativo para infecção por *B. canis* e proveniente de canil comercial sem história de problemas reprodutivos recentes. As amostras de sangue deste animal eram negativas para prova de isolamento e identificação bacteriana.

As amostras de sangue foram colhidas por punção das veias cefálicas ou jugular, em tubos de colheita a vácuo contendo citrato de sódio e separadas em duas alíquotas. Uma alíquota de sangue (2mL) foi testada para isolamento e

identificação bacteriana e outra alíquota (1mL) foi estocada a -20°C até ser testada pela PCR. Para a colheita de sangue, os animais não foram submetidos a anestesia.

4.1.3 Amostras de sangue de cães de condição desconhecida quanto à infecção por *Brucella* spp. (amostras de campo)

Para a comparação das técnicas de PCR e isolamento e identificação bacteriana foram utilizadas 75 amostras de sangue de cães provenientes de canis comerciais com história clínica de sinais reprodutivos compatíveis com a infecção por *Brucella*.

As amostras de sangue destes animais foram colhidas exatamente como descrito no 4.1.2.

4.2 Isolamento e identificação bacteriana

4.2.1 Isolamento em meio de cultura

As amostras de sangue dos itens 4.1.2 e 4.1.3 foram inoculadas em Caldo Fosfato Triptose (Vetec) e incubadas em aerobiose a 37°C durante 30 dias (ALTON, 1978). A cada cinco dias foram realizados repiques em placas contendo Ágar Sangue Triptose (Vetec), as quais foram incubadas a 37°C , em aerobiose, durante

cinco dias, possibilitando a observação do crescimento de colônias, bem como seu isolamento para posterior identificação.

4.2.2 Características Morfológicas

Foram considerados a forma e o aspecto das colônias isoladas, bem como suas características tintoriais pela coloração de Gram e microscopia óptica (ALTON et al., 1988).

4.2.3 Características Bioquímicas

As bactérias isoladas que apresentaram características morfológicas e tintoriais semelhantes ao gênero *Brucella* foram submetidas às seguintes provas bioquímicas: produção de H₂S, fermentação de açúcares, produção de gás, urease, indol, motilidade, utilização de citrato, redução de nitratos, oxidase, catalase e crescimento em ágar MacConkey (ALTON et al., 1988).

O isolamento e identificação bacteriana foram realizados pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3 Extração de ácidos nucleicos

4.3.1 Extração do DNA de bactérias oriundas de cultura pura

1. Suspende uma alça coletada da colônia pura de *Brucella* em 400 μ L de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Duodecil Sulfato de Sódio 1%; 10 μ L Proteinase K a 20mg/mL);
2. Agitar por 10 segundos em vortex;
3. Incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) a 37°C por 24 horas sob agitação por 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
4. adicionar 70 μ L de NaCl a 5M;
5. Agitar por 10 segundos em vortex;
6. Adicionar 65 μ L de solução NaCl/CTAB (10% CTAB / 0,7M NaCl);
7. Agitar por 10 segundos em vortex;
8. Incubar a 65°C durante 10 minutos em termobloco sem agitação;
9. Adicionar 635 μ L de clorofórmio;
10. Agitar por 10 segundos em vortex;
11. Centrifugar a 13.000 x g por 10 minutos;
12. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500 μ L, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
13. Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio;
14. Agitar por 10 segundos em vortex;
15. Centrifugar a 13.000 x g por 10 minutos;

16. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500 μ L, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
17. Adicionar igual volume de propanol puro;
18. Homogeneizar por inversão e manter a -20°C *overnight*;
19. Centrifugar a 13.000 x g por 20 minutos;
20. Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar 1000 μ L de etanol 70% a 5°C ;
21. Agitar por 10 segundos em vortex;
22. Centrifugar a 13.000 x g por 15 minutos;
23. Descartar o sobrenadante por inversão;
24. Secar o sedimento em termobloco sem agitação a 56°C por 10 minutos;
25. Adicionar 30 μ L de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
26. Incubar em termobloco sem agitação a 56°C por 30 minutos;
27. Estocar a -20°C até o momento do uso.

4.3.2 Extração do DNA a partir de sangue periférico total de cães

Amostras de sangue periférico dos cães descritos nos itens 4.1.2 e 4.1.3 foram submetidas ao seguinte protocolo:

1. Descongelar a temperatura ambiente o sangue estocado a -20°C e a seguir transferir 1,0mL para um microtubo novo;
2. Adicionar 500 μ L de TE pH 8,0;

3. Agitar por 10 segundos em vortex;
4. Centrifugar 13.000 x g por 5 minutos;
5. Descartar o sobrenadante num Becker com uma mistura de água e hipoclorito de sódio a 2,5%;
6. Adicionar 1000 μ L de TE pH 8,0;
7. Agitar por 10 segundos em vortex;
8. Centrifugar 13.000 x g por 5 minutos;
9. Descartar o sobrenadante num Becker com uma mistura de água e hipoclorito de sódio a 2,5%;
10. Repetir a partir do passo 6. até que o sobrenadante obtido no passo 9 esteja claro;
11. Suspender o sedimento obtido em 400 μ L de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Duodecil Sulfato de Sódio 1%; 10 μ L Proteinase K a 20mg/mL);
12. Seguir exatamente a partir do passo 2., descrito no item 4.3.1.

4.4 Quantificação de DNA

Alíquotas da solução de DNA de cada amostra-padrão oriunda de cultura pura, bem como alíquotas da solução de DNA obtidas de sangue periférico total de cada amostra de cão foram diluídas 1:100 em TE e submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU® 640 (BECKMAN, Fullerton, CA, USA).

Para a determinação de concentração de DNA foram consideradas apenas as leituras das amostras cujas razões entre as absorbâncias obtidas a 260nm e 280nm estiveram compreendidas entre 1,8 e 2,0.

4.5 Primers

As seqüências ITS dos organismos *Acetobacter acetii* AJ007831, *Bartonella bacilliformis* AJ422182, *Agrobacterium* AF345274, *Mesorhizobium mediterraneum* AF345261, *B. melitensis* X95890, *B. suis* X95891, *B. abortus* X95889, *Agrobacterium tumefaciens* AE009348, *O. anthropi* X95892, foram obtidas no sítio do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) após busca por similaridade através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando, como termo de busca, a seqüência ITS de *B. abortus* X95889.

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado através do programa Bioedit v 5.0.9. (HALL, 1999) e verificou-se que somente o organismo *O. anthropi* possuía similaridade significativa com as seqüências de *Brucella*.

A partir desse alinhamento procurou-se por regiões que tivessem similaridade máxima entre as seqüências de *Brucella* e baixa similaridade com seqüência de *O. anthropi*. Após as identificações destas regiões, dois pares de *primers* com características termodinâmicas compatíveis entre si (para cada par) foram desenhados com auxílio do programa Oligo (RYCHLIK; RHOADS, 1989).

Os *primers* desenhados foram (figura 1):

- ITS1F: ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA
- ITS1R: AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC
- ITS2F: TCA TGT TGG TGT TGA GAC GGA
- ITS2R: AAC TCA GCT CTT AAA GCC GCA

Um terceiro par de primer foi desenhado a partir do alinhamento entre todas as seqüências codificadoras da proteína BP26 disponíveis no GenBank. Para o gênero *Brucella* foram encontradas seqüências para as espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. ovis*.

Da mesma forma que para os *primers* ITS, procurou-se por regiões que tivessem identidade total entre as seqüências de *Brucella* e, após a identificação destas regiões, dois pares de *primers* com características termodinâmicas compatíveis entre si foram desenhados com auxílio do programa Oligo.

Os *primers* desenhados foram:

- BP26F: AGG AGA ATC AGA TGA CGA CGC A
- BP26R: GGT AGG CTC TTT CAG GTT GTT C

	10	20	30	40	50	60	
B.abortus	TAAGGAAGATCGAGAATTGGAAGAGGTCGGATTTATCCGGATGATCCTTCTCCATCTTA	60					
B.melitensis		60					
B.suis	G.....C.....	60					
O.anthropi	A.....C.CA.TC..CGGG.T.....	60					
	70	80	90	100	110	120	
B.abortus	TTAGAACATAGATCGCAGGCCAGTCAGCCTGACGATCGCTT-GCAGGCGTGCCGCCTTCG	119					
B.melitensis		119					
B.suis	N.....	119					
O.anthropi	T.....	120					
	130	140	150	160	170	180	
B.abortus	TTTCTCTTTCTTCATTGTTGATTG-----CTCACGGGCCGTACCGCAGCTGAC	167					
B.melitensis		167					
B.suis		167					
O.anthropi	ACACTTGTACCG.....A.....TT.....-	179					
	190	200	210	220	230	240	
B.abortus	GCTGCT-GGCCCTGCGCAGGCGCGGCCCATCAGGGCCGACGGCCGGTCGGCCTTGCAAG	226					
B.melitensis		226					
B.suis	N.....G...	226					
O.anthropi	T...T.....GA.....C.G...G..C.G.....A.TAG..T...GTATTT.	239					
	250	260	270	280	290	300	
B.abortus	CTTCGCTTCGGGGTGGATCTGTGGATCGCGTAGTAGCGTTTGCGTCGGTATCTGGGCTTG	286					
B.melitensis		286					
B.suis		286					
O.anthropi	G...--AAC..T.T.T.TGT...T..TGA..CA..-----	279					
	310	320	330	340	350	360	
B.abortus	TAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCCTCCC	346					
B.melitensis		346					
B.suis		346					
O.anthropi		339					
	370	380	390	400	410	420	
B.abortus	AGGCCACCAAGTTACTTGATGAGGGGCCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCA	406					
B.melitensis		406					
B.suis		406					
O.anthropi	A..G--...A.....A.....	397					

Figura 1. Alinhamento entre as seqüências ITS de *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *Ochrobactrum anthropi*. São Paulo – 2004 (continua)

Os números acima das seqüências referem-se a posição de cada caractere molecular no alinhamento. Os números à direita referem-se à posição, no alinhamento, do último caractere de cada seqüência no bloco considerado. Os pontos identificam caracteres idênticos enquanto os traços referem-se a inserções ou deleções (*gaps*). Posições dos primers no alinhamento: ITS1F de 66 a 86, ITS1R de 273 a 293, ITS2F de 460 a 487 e ITS2R de 744 a 764. Números de acesso no GenBank para as seqüências: *B. abortus* X95889, *B. suis* X95891, *B. melitensis* X95890 e *O. anthropi* X95892.

	430	440	450	460	470	480	
B.abortus	AGCAGGGGGTCGTCGGTTCGATCCCGTCCGGCTCCACCATCA	---	TGTTGGTGTGAG	---			461
B.melitensis							461
B.suis							461
O.anthropi	T.....	CTT.T.....	C...TA				457
	490	500	510	520	530	540	
B.abortus	--ACGGATATT--	GGCAATCAACAAAAGAAAGAAACAAGTTT	GCGGACTNTTACGAAAGT				517
B.melitensis							517
B.suis							517
O.anthropi	GG.....	GACA.T..G.....	G.....	C.....	T.-.....	-.	515
	550	560	570	580	590	600	
B.abortus	CTGCCCTGTTCTGTATGAAATCGTGAAGAGAAGATGTAATCGGATCAACTGAAGAGTTGAT						577
B.melitensis							577
B.suis							577
O.anthropi	G.....				ATCC.....		575
	610	620	630	640	650	660	
B.abortus	GTCGCAAGAAGCTTGCTCAAGCCTTGATAATGATTGATGTGTTTAACCGCCATCACC	GA					637
B.melitensis							637
B.suis							637
O.anthropi	TG-.T.....	A.....	T.....	---.ACGC.....	GC-.....		631
	670	680	690	700	710	720	
B.abortus	TTGTATCTCGAGAAGCTGGTCTTTCTGCTGATACTGTTGAAACGAGCATTTGCAGTCGAA						697
B.melitensis							697
B.suis							697
O.anthropi				---.TCA....	-----		674
	730	740	750	760	770	780	
B.abortus	TGGCAACATTTCGGCGTCGCATAATGCGGCTTTAAGAGCTGAGTTTGGATGGATATTGGCA						757
B.melitensis							757
B.suis							757
O.anthropi	-----T.....						698
	790	800	810	820	830	840	
B.abortus	ATGAGAGT						765
B.melitensis							765
B.suis							765
O.anthropi							706

Figura 1: Alinhamento entre as seqüências ITS de *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *Ochrobactrum anthropi*. São Paulo – 2004 (conclusão)

4.6 Determinação da temperatura de *annealing* (Ta°C) ótima para os diferentes pares de *primers*

Para a determinação da melhor Ta°C a ser adotada para a PCR com os diferentes *primers* empregados neste estudo, foram realizados os seguintes experimentos:

4.6.1 Determinação da Ta°C do par de *primer* BP26

Para a determinação da Ta°C para o par de *primer* BP26F e BP26R foi utilizado o DNA extraído de uma colônia de *Brucella abortus*, da estirpe vacinal 1119-3.

Foram empregadas 11 PCRs com Ta°C variáveis e utilizando as seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por dois minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, Ta°C* por um minuto, 72°C por um minuto e 30 segundos e aquecimento final a 72°C por cinco minutos. O termociclador utilizado foi do modelo Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

*Os valores de Ta°C, diferentes para cada uma das onze PCRs foram de: 59,1°C; 59,4°C; 60,2°C; 61,2°C; 62,5°C; 63,8°C; 65,2°C; 66,5°C; 67,7°C; 68,6°C; 69,2°C.

A concentração dos reagentes utilizados para amplificação foi: 200µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 0,5µM de cada *primer*, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 Unidades de

Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 5µL da amostra e água ultra pura obtida em aparelho Milli-Q-Millipore Inc (Billerica, MA USA).

4.6.2 Determinação da Ta°C dos pares de *primers* ITS1 e ITS2

Para a determinação da Ta°C dos pares de *primers* ITS1 e ITS2 foi utilizado o DNA extraído de uma colônia de *Brucella canis* RM6/66.

Foram empregadas 11 PCRs com Ta°C variáveis, utilizando as seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por dois minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, Ta°C* por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e aquecimento final a 72°C por cinco minutos. O termociclador utilizado foi da marca Eppendorf Mastercycler Gradient.

*Os valores de Ta°C, diferentes para cada uma das onze PCRs, foram de: 47,9°C, 48,6°C, 50,1°C, 52,1°C, 54,6°C, 57,2°C, 60,0°C, 62,6°C, 64,9°C, 66,7°C, 67,9°C para o ITS1 e, 42,9°C, 43,6°C, 45,0°C, 47,1°C, 49,5°C, 52,2°C, 54,9°C, 57,5°C, 59,9°C, 61,7°C, 63,0°C para o ITS2.

As concentrações dos reagentes para a PCR foram idênticas àquelas empregadas no item 4.6.1.

4.7 Determinação da sensibilidade analítica das PCRs utilizando os *primers* BP26, ITS1 e ITS2

4.7.1 Sensibilidade analítica em TE

A partir de 30µL de DNA extraído da *Brucella canis* RM 6/66 com leitura espectrofotométrica na razão 260/280nm de 1,9218 e concentração no valor de 37,8µg/mL, foram preparadas as seguintes diluições de DNA bacteriano em TE: 37,8pg/uL, 378fg/uL, 37,8fg/uL, e 3,78fg/uL.

Um microlitro de cada uma das diluições acima foi adicionado a 4µL de TE e cada mistura foi então submetida a três PCRs com os diferentes pares de *primers*, designadas PCR-BP26, PCR-ITS1 e PCR-ITS2 (ver a seguir). Como controle negativo foi utilizado, para cada PCR, 5µL de TE.

A PCR-BP26 foi realizada nas seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por dois minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e aquecimento final a 72°C por cinco minutos. O termociclador utilizado foi da marca PTC-200 DNA Engine Version 3.0 (MJ Research Massachusetts, USA). A concentração dos reagentes foi a mesma utilizada no item 4.6.1

As PCR-ITS1 e PCR-ITS2 foram realizadas nas mesmas condições descritas acima, exceto por uma adoção de Ta°C de 62,6°C para o par de *primer* ITS1 e 61,7°C para o par de *primer* ITS2.

4.7.2 Sensibilidade analítica em sangue experimentalmente contaminado

A partir das diluições de DNA bacteriano descritas no item 4.7.1, foram realizados experimentos para avaliar a sensibilidade analítica da PCR-ITS1 em amostras de sangue contaminadas artificialmente com DNA de *Brucella*.

Assim, 1µL de cada diluição de DNA bacteriano foi misturado a 4µL de DNA cão (a uma concentração de DNA de 112,5µg/mL) de maneira a obter as seguintes amostras, em um volume final de 5µL cada:

Amostra 1: 37,8pg de DNA de bactéria + 450ng de DNA de cão

Amostra 2: 378fg de DNA de bactéria + 450ng de DNA de cão

Amostra 3: 37,8fg de DNA de bactéria + 450ng de DNA de cão

Amostra 4: 3,78fg de DNA de bactéria + 450ng de DNA de cão

Amostra 5: 450ng de DNA de cão

4.8 Amplificação das amostras-padrão

Todas as amostras constantes na tabela 1, cujos DNAs foram extraídos conforme metodologia descrita no item 4.3.1. foram submetidas às três PCRs descritas nos itens 4.7.1.

4.9 Amplificação das amostras de campo

Cada amostra de 1mL de sangue de cão descrita em 4.1.3 teve o DNA extraído e dissolvido em 30 μ L de TE, seguindo-se o protocolo descrito no item 4.3.2.

Uma alíquota de 5 μ L de cada uma das amostras de DNA obtidas no item 4.3.2. foi diluída na razão 1:10 em TE. Desta forma, obteve-se, para cada amostra de sangue de cão, 25 μ L de DNA não diluído e 50 μ L de DNA diluído 1:10.

As PCRs descritas no item 4.7.1 foram empregadas em 5 μ L de DNA diluído e em 5 μ L de DNA não diluído de cada uma das 75 amostras de cão.

4.10 Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8,0). O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V / cm.

A imersão do gel numa solução de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL durante 20 minutos e posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK et al., 1989). Estas foram comparadas com um padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas somente para a comparação entre o isolamento e identificação bacteriana e a PCR-ITS1 aplicadas em amostras não diluídas.

O teste de McNemar (McNEMAR, 1947) foi utilizado para avaliar a igualdade entre as proporções de positividade geradas pela PCR-ITS1 e o isolamento e identificação bacteriológica, tendo sido calculado o intervalo de confiança 95% para a diferença entre as proporções de positividade. Ainda, a concordância entre ambas as provas foi aferida com a avaliação do coeficiente *Kappa* (COHEN, 1960).

A determinação de qui-quadrado com correção de Yates (COCHRAN, 1954) foi utilizada para avaliar a concordância entre PCR-ITS1 e isolamento e identificação bacteriológica no mesmo indivíduo.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação bacteriana de amostras de sangue

Foram identificadas como pertencentes ao gênero *Brucella* as colônias bacterianas isoladas na forma de cocobastonetes Gram-negativos, apresentando as seguintes características bioquímicas: oxidase positivas, catalase positivas, gelatina negativa, McConkey negativas, fermentação negativas, citrato negativas, urease positivas, indol negativas, não móveis, H₂S negativas, nitrato positivas.

Os resultados de isolamento e identificação bacteriana das 75 amostras de sangue descritas no item 4.1.3. estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultados das mensurações de DNA e resultados das diferentes PCRs nas amostras de DNA de sangue de cães positivas pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de *Brucella* spp. São Paulo - 2004

¹ Amostra	² razão 260/280	³ conc. µg/mL	⁴ ITS1	⁵ ITS2	⁶ BP26	⁷ ITS1 1:10	⁸ ITS2 1:10	⁹ BP26 1:10
52	1,5321	5,6825	+	-	-	+	-	-
56	1,4683	8,5936	+	-	-	+	-	-
663	1,9125	9,1936	+	-	-	+	-	-
672	1,9169	74,5198	-	-	-	+	-	-
673	1,9344	36,1226	+	-	-	+	-	-
777	1,9256	20,3755	+	-	+	+	-	-
800	1,9045	65,1135	+	+	+	+	-	-
844	1,8774	134,7330	+	-	-	-	-	-
848	1,8455	56,5173	+	+	-	+	-	-
849	1,8974	65,6263	+	+	-	+	-	-
854	1,9549	39,1733	+	-	-	-	-	-
855	1,9149	69,5252	+	-	-	+	-	-
856	1,9482	20,9202	+	-	-	+	-	-
860	1,8950	92,0783	+	-	-	+	-	-
863	1,9163	97,4809	-	-	-	-	-	-
732	1,9794	46,4864	+	-	+	+	-	-
751	1,9210	158,3332	+	-	-	-	-	-
766	1,9177	139,2051	+	-	-	-	-	-
768	1,8201	146,0851	+	-	-	+	-	-
771	1,9006	164,5679	+	-	+	+	+	+
772	1,8729	125,9042	+	+	+	+	-	-
773	1,8597	144,6015	+	+	+	+	-	-
774	1,9160	183,4414	+	+	+	+	-	-
775	1,7580	128,2167	+	-	-	-	-	-
776	1,8443	125,2417	+	+	+	+	-	-
583	1,8949	82,7096	-	-	-	-	-	-
584	1,9039	177,1969	+	-	-	+	-	-
614	1,9071	87,5197	-	-	-	-	-	-
659	1,9184	74,7856	-	-	-	-	-	-
665	1,9653	42,4719	+	+	-	+	-	-
729	1,9144	77,6240	+	-	-	-	-	-
707	1,9141	56,9575	+	-	-	+	-	-
813	1,9042	132,1080	+	-	-	-	-	-
825	1,8803	69,0204	+	-	-	-	-	-
955	1,9199	122,3630	+	+	+	+	-	-

¹ identificação das amostras

² razão entre as absorvâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/mL

⁴ resultados da PCR-ITS1

⁵ resultados da PCR-ITS2

⁶ resultados da PCR-BP26

⁷ resultados da PCR-ITS1 em amostras de DNA diluídas 1:10

⁸ resultados da PCR-ITS2 em amostras de DNA diluídas 1:10

⁹ resultados da PCR- BP26em amostras de DNA diluídas 1:10

+ resultado positivo

- resultado negativo

Tabela 3 - Resultados das mensurações de DNA e resultados das diferentes PCRs nas amostras de DNA de sangue de cães negativas pelo isolamento e identificação bacteriológica para a presença de *Brucella* spp. São Paulo - 2004

¹ Amostra	² razão 260/280	³ conc. µg/mL	⁴ ITS1	⁵ ITS2	⁶ BP26	⁷ ITS1 1:10	⁸ ITS2 1:10	⁹ BP26 1:10
53	1,7726	3,9234	+	-	-	-	-	-
55	2,0071	10,9580	+	-	-	-	-	-
57	1,4437	4,6546	+	-	-	-	-	-
59	1,9220	11,2421	-	-	-	-	-	-
60	2,2354	1,8465	+	-	-	-	-	-
63	1,9327	16,3104	-	-	-	-	-	-
107	1,6333	2,4001	-	-	-	-	-	-
109	2,0361	2,1700	-	-	-	-	-	-
110	1,9687	2,0337	-	-	-	-	-	-
111	1,6580	2,4001	-	-	-	-	-	-
118	1,3816	1,8040	-	-	-	-	-	-
119	2,8536	0,6504	-	-	-	-	-	-
120	2,2342	1,6509	+	-	-	-	-	-
121	1,3940	2,4598	-	-	-	-	-	-
628	1,9063	33,7312	-	-	-	-	-	-
629	1,7854	33,4873	-	-	-	-	-	-
630	1,8577	75,7105	-	-	-	-	-	-
634	1,8027	37,1545	+	-	-	-	-	-
635	1,8142	35,0037	-	-	-	-	-	-
976	1,8652	94,6801	-	-	-	-	-	+
977	1,8560	59,5699	+	-	-	+	-	-
978	1,8780	91,0570	-	-	-	-	-	-
979	1,8717	96,9142	-	-	-	-	-	-
981	1,8573	159,9762	-	-	-	-	-	-
983	1,8618	82,2618	+	-	-	-	-	-
984	1,8629	84,9141	-	-	-	-	-	-
985	1,8756	94,3960	-	-	-	-	-	-
986	1,8767	107,8381	-	-	-	-	-	-
987	1,5043	187,1644	-	-	-	-	-	-
733	1,4534	0,6061	+	-	-	-	-	-
840	1,9483	8,9746	-	-	-	-	-	-
841	1,9499	11,2573	-	-	-	-	-	-
842	1,9723	11,7828	-	-	-	-	-	-
843	1,9137	16,9985	+	-	-	-	-	-
846	2,0862	8,2044	-	-	-	+	-	-
853	1,8600	12,7747	-	-	-	-	-	-
858	2,0142	13,9693	-	-	-	-	-	-
859	2,0206	13,3577	-	-	-	-	-	-
864	2,0386	11,2929	+	-	-	-	-	-
866	1,9761	14,0594	-	-	-	-	-	-

¹ identificação das amostras

² razão entre as absorbâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/mL

⁴ resultados da PCR-ITS1

⁵ resultados da PCR-ITS2

⁶ resultados da PCR-BP26

⁷ resultados da PCR-ITS1 em amostras de DNA diluídas 1:10

⁸ resultados da PCR-ITS2 em amostras de DNA diluídas 1:10

⁹ resultados da PCR- BP26em amostras de DNA diluídas 1:10

+ resultado positivo

- resultado negativo

5.2 Determinação da temperatura de *annealing* (Ta°C) ótima para os diferentes pares de *primers*

Das 11 PCRs empregadas com Ta°C variável obteve-se os seguintes resultados, para cada um dos pares de *primers*:

BP26: 61,2°C

ITS1: 62,6°C

ITS2: 61,7°C

O critério utilizado para a escolha das Ta°C foi: escolher a temperatura com valor máximo e que produzisse a maior intensidade de banda.

5.3 Determinação da sensibilidade analítica das PCRs utilizando os primers BP26, ITS1 e ITS2

5.3.1 Sensibilidade analítica em TE

Nas Figuras 2 e 3 estão apresentadas as sensibilidades analíticas das PCRs utilizando os pares de *primers* ITS1 e ITS2 e BP26 em diluições seriadas, respectivamente.

De 1 a 5 PCR-ITS1, de 7 a 11 PCR-ITS2

- 1) 37,8pg DNA bacteria
- 2) 378fg DNA bacteria
- 3) 37,8fg DNA bacteria
- 4) 3,78fg DNA bacteria
- 5) TE
- 6) padrão de peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases
- 7) 37,8pg DNA bacteria
- 8) 378fg DNA bacteria
- 9) 37,8fg DNA bacteria
- 10) 3,78fg DNA bacteria
- 11) TE

Figura 2 – Sensibilidade analítica das PCR-ITS1 e PCR-ITS2 em diluições seriadas em TE. São Paulo - 2004

De 1 a 5 PCR-BP26

1) 37,8pg DNA bacteria

2) 378fg DNA bacteria

3) 37,8fg DNA bacteria

4) 3,78fg DNA bacteria

5) TE

6) Padrão de peso molecular, múltiplos de 100 pares de base

Figura 3 - Sensibilidade analítica das PCRs utilizando o *primer* BP26 em diluições seriadas em TE.
São Paulo - 2004

5.3.2 Sensibilidade analítica em sangue contaminado

A figura 4 ilustra os resultados de sensibilidade analítica da PCR-ITS1 em sangue experimentalmente contaminado.

- 1) padrão de peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases
- 2) 37,8pg DNA bacteria + 450ng DNA cão
- 3) 378fg DNA bacteria + 450ng DNA cão
- 4) 37,8fg DNA bacteria + 450ng DNA cão
- 5) 3,7fg DNA bacteria + 450ng DNA cão
- 6) 450ng de DNA de cão

Figura 4 – Sensibilidade analítica da PCR-ITS1 em sangue experimentalmente contaminado. São Paulo - 2004

5.4 Amplificação das amostras padrão

Todas as amostras-padrão foram positivas para as PCRs descritas no item 4.7.1.

5.5 Amplificação das amostras de campo

Os resultados das PCRs descritas no item 4.9 nas 75 amostras de DNA não diluído e diluídos na razão 1:10 extraído de sangue dos animais estão

apresentados nas Tabelas 2 e 3, assim como os resultados obtidos através da espectrofotometria.

A comparação entre os resultados das PCRs descritas no item 4.9, tomando como referência os resultados obtidos com o procedimento de isolamento e identificação bacteriana sobre as amostras de DNA não diluído e extraído de sangue dos animais descritos no item 4.1.3, estão apresentados nas tabelas de contingência ilustradas abaixo (tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

Tabela 4 - Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes sangue de cães pela PCR-ITS1 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR ITS1		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	30	5	35
	-	11	29	40
TOTAL		41	34	75

Tabela 5 – Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes sangue de cães pela PCR-ITS2 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR ITS2		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	9	26	35
	-	0	40	40
TOTAL		9	66	75

Tabela 6 – Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas provenientes sangue de cães pela PCR-BP26 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR BP26		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	9	26	35
	-	0	40	40
TOTAL		9	66	75

Tabela 7 – Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes sangue de cães pela PCR-ITS1 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR ITS1		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	22	13	35
	-	2	38	40
TOTAL		24	51	75

Tabela 8 – Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes sangue de cães pela PCR-ITS2 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR ITS2		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	1	34	35
	-	0	40	40
TOTAL		1	74	75

Tabela 9 – Classificação dos resultados obtidos das amostras clínicas diluídas 1:10 provenientes sangue de cães pela PCR-BP26 e pelo isolamento e identificação bacteriológica para *Brucella* spp. São Paulo - 2004

		PCR BP26		TOTAL
		+	-	
Isolamento	+	1	34	35
	-	0	40	40
TOTAL		1	74	75

5.6 Análises estatísticas

Pelo teste de McNemar, os dados revelam $X^2 = 1,56$ e $p = 0,2113$. O intervalo de confiança 95% da diferença encontrada entre as proporções de positividade geradas pelos métodos de diagnóstico avaliados foi de $[-0,02; 0,18]$ em favor da PCR-ITS1.

A estatística para avaliar concordância no mesmo indivíduo revela $X^2 = 23,23$ (com correção de Yates) e $p = 0,000002$. O valor para o coeficiente de concordância *Kappa* foi de 0,576, indicativo de concordância moderada.

6 DISCUSSÃO

A PCR é uma prova que tem sido utilizada para detectar presença de DNA de *Brucella* em diversos tipos de amostras, de várias espécies animais (FEKETE et al., 1990; GALLIEN et al., 1998; GUARINO et al., 2000; HERMAN et al., 1992; KEID, 2001; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; MATAR et al., 1996; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; ROMERO et al., 1995b; SERPE et al., 1999;). Entretanto, poucos trabalhos descrevem o emprego da PCR para a detecção de DNA de *Brucella* spp. em cães naturalmente infectados (KEID, 2001).

Para o diagnóstico da infecção em humanos, a PCR para detecção de DNA de *Brucella* vem sendo bastante utilizada em amostras de sangue (MATAR et al., 1996; MORATA et al., 1998; NAVARRO et al., 1999; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997). Em animais, a PCR aplicada em amostras de sangue foi empregada para o diagnóstico direto da infecção em búfalos (GUARINO et al., 2000), não tendo sido encontrados, na literatura compulsada, registros da utilização desta técnica para detecção de DNA de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados.

O interesse expresso neste trabalho em desenvolver um método direto para ser empregado para detecção do agente em amostras de sangue é justificado pelo prolongado período de bacteremia verificado em cães acometidos pela *B. canis*.

Keid (2001) propôs uma PCR para detecção de DNA de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados utilizando os *primers* B4 e B5 desenhados por Baily et al. (1992). Porém, mesmo após inúmeras alterações no grau de estringência da PCR, não foi possível a detecção de DNA de *Brucella* spp. em sangue periférico de cães naturalmente infectados. Em muitos casos, a PCR gerava

múltiplos fragmentos, tornando impossível a visualização de um sinal único, referente ao fragmento de 223 pares de bases, produzido pela amplificação de um fragmento do gene que codifica a proteína 31kDa.

Assim, com vistas a encontrar um novo alvo para identificação de *Brucella* por PCR, foi proposto, no presente estudo, o desenho de três pares de *primers*, sendo dois deles direcionados à região interespaçadora do gene 16S-23S do rRNA e outro par direcionado à região codificadora de uma proteína periplasmática da membrana externa da *Brucella*, a proteína BP26.

A escolha da região interespaçadora do gene 16S-23S do rRNA de *Brucella* spp. para se desenhar *primers* para a detecção deste agente ocorreu pelo fato de esta seqüência apresentar pouca similaridade com seqüências homólogas de outros organismos filogeneticamente relacionados à *Brucella*. Ao contrário, seqüências ITS de *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* quando comparadas entre si possuem similaridade praticamente total.

A bactéria *O. anthropi*, um membro da subdivisão α -2 da classe *Proteobacteria*, é o microorganismo geneticamente mais próximo à *Brucella* que se tem conhecimento (VELASCO et al., 1998; VELASCO et al., 2000). De fato, embora infecções por este agente em animais sejam assintomáticas e raras, vale ressaltar que os *primers* mais utilizados para detecção de *Brucella* spp., amplificam seqüências de *O. anthropi*. Casanas et al. (2001) verificaram que os *primers* B4 e B5 desenhado por Baily et al. (1992) também amplificam material genético de *O. anthropi*. Romero et al. (1995a) desenharam os *primers* F4 e R2 derivados do gene 16S do rRNA que também apresentaram um sinal fraco quando testados frente ao *O. anthropi*.

Rijpens et al. (1996), desenharam *primers* direcionados a região interespaçadora do gene 16S-23S do rRNA, com vistas a caracterizar molecularmente estas seqüências. Porém, estes *primers* amplificam fragmentos grandes, quase a totalidade da seqüência ITS (RIJPENS et al., 1996), o que não é recomendável para uma PCR para ser utilizada para detecção de microorganismos diretamente de amostras clínicas, pois a eficiência da PCR tende a ser inversamente proporcional à dimensão do fragmento amplificado. Ainda, os *primers* estão desenhados em *nested*, o que não é de interesse, uma vez que a proposta é desenvolver uma técnica simplificada (em termos operacionais) para detecção de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados. Outro fator a desencorajar a aplicação de *nested*PCR é que, embora os ensaios em *nested* possam aumentar a sensibilidade da PCR em 100 a 1000 vezes, trata-se de um procedimento muito propenso a contaminação laboratorial.

A escolha da fração periplasmática BP26 ocorreu pelo fato de que esta se encontra presente em todas as espécies de *Brucella*, mas não se encontra presente na região periplasmática da *Yersinia enterocolitica*, um agente que freqüentemente causa reações cruzadas com *Brucella* spp. (ROSSETTI et al., 1996).

No presente trabalho, a sensibilidade analítica da PCR utilizando-se os *primers* ITS1 não foi afetada quando acrescentado DNA genômico de cão nas amostras contendo DNA de *Brucella*. A PCR-ITS1 foi capaz de detectar 3,78fg de DNA bacteriano misturado em TE ou misturado a 450ng de material genético de cão. Teoricamente, 3,78fg de DNA bacteriano corresponde ao material genético de 1,26 bactérias, enquanto 450ng seria a quantidade de DNA submetida a reação de PCR de uma amostra de DNA extraída de sangue de cão que estivesse a uma

concentração de 90µg/mL, um valor próximo ao das médias das concentrações das mostras positivas (88,0µg/mL).

Vale ressaltar que a amostra 774 (tabela 2), com concentração de DNA no valor de 183,4414µg/mL foi positiva em todas as PCRs, quando testada sem ser diluída. Neste caso, considerando que as PCRs foram realizadas em 5µL de amostra de DNA, verifica-se que uma quantidade superior a 0,9µg de DNA foi submetida a cada PCR e, para os três casos, foi classificada como positiva.

Ao se diluir as amostras provenientes de cães naturalmente infectados, observou-se uma diminuição na porcentagem de amostras positivas em todas as PCRs, inclusive na PCR-ITS1.

Pelo que se apresenta, nas amostras submetidas ao protocolo ora avaliado, provavelmente não há presença de inibidores da reação nem tampouco a quantidade elevada de DNA (até 0,9µg de DNA por PCR) em algumas amostras deva ter efeito inibitório sobre a reação de PCR. Segundo SAMBROOK et al. (1989), o valor de 1,8 a 2,0 obtido pela relação entre as absorbâncias registradas a 260nm e 280nm indica um DNA com bom grau de pureza, apresentando pouca contaminação protéica. Neste trabalho, a maioria das amostras teve a razão entre as absorbâncias acima citadas entre 1,8 e 2,0 (tabelas 2 e 3).

Navarro et al. (2002) observaram que as sensibilidades analíticas dos pares de *primers* B4/B5 (BAILY et al., 1992), JPF/JPR (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995) e F4/R2 (ROMERO et al., 1995a) eram diferentes. NAVARRO et al. (2002) observaram que a sensibilidade maior dos *primers* F4/R2 para a detecção de DNA de *Brucella* pode ser devido ao fato de que eles amplificam uma região do gene 16S RNA presente em várias cópias no genoma bacteriano. Por outro lado, os *primers* JPF/JPR amplificam uma região de um gene presente em duplicata (*omp2*) que

codifica uma proteína de membrana externa e os *primers* B4/B5 amplificam fragmentos de um gene presente em apenas uma cópia no genoma bacteriano.

Ainda neste trabalho, NAVARRO et al. (2002), concluíram que a presença de DNA genômico humano causava um decréscimo acentuado na sensibilidade analítica da PCR quando os pares de *primers* F4/R2 e B4/B5 foram utilizados. A conclusão a que os autores chegaram foi de que provavelmente a hibridização competitiva não específica de grande quantidade do DNA genômico humano afetava a sensibilidade da técnica da PCR.

O desempenho dos *primers* JPF/JPR, por outro lado não foi afetado pela presença do DNA genômico humano. Porém, neste caso, os autores especulam que este fato não seja devido a uma propriedade intrínseca desses *primers*, uma vez que foi usada quatro vezes mais *primers* e cinco vezes mais *Taq* DNA polimerase (de acordo com o protocolo original) do que a quantidade utilizada para os outros *primers*.

Com os *primers* ITS2 e BP26 a pouca concordância entre cultivo bacteriano e a técnica de PCR pode decorrer do fato de que estes apresentam sensibilidade analítica baixa. Tanto para o ITS2 como para o BP26, das 75 amostras analisadas, 35 amostras foram positivas pelo cultivo bacteriano e destas apenas nove foram positivas pela técnica de PCR, enquanto que das 40 amostras negativas em cultivo bacteriano nenhuma foi positiva pela técnica de PCR, mesmo aquelas que foram positivas para o ITS1 (tabela 3).

Apesar dos *primers* ITS1 e ITS2 terem sido desenhados a partir do mesmo gene (16S-23S rRNA), porém em localizações opostas, as discordâncias entre seus resultados provavelmente se deve às diferenças em suas características termodinâmicas.

Em relação à comparação do desempenho dos *primers* ITS1 e BP26 o que se pode ressaltar é que o *primer* BP26 foi desenhado a partir do gene que codifica uma proteína periplasmática o qual se apresenta apenas em uma cópia no genoma bacteriano, enquanto que o *primer* ITS1 foi desenhado a partir do gene 16S-23S, que por sua vez apresenta-se em pelo menos três cópias no genoma da *Brucella* (MICHAUX-CHARACHON et al., 1997; JUMAS-BILAK et al., 1998).

Porém vale ressaltar que não foram realizadas tentativas de otimização das PCR-ITS2 e PCR-BP26 em virtude do seu baixo desempenho apresentado nos experimentos para determinação da sensibilidade analítica em cultura pura. Por esta razão, todas as comparações e avaliações estatísticas foram feitas somente para a PCR-ITS1.

Utilizando-se o par de *primer* ITS1, verificou-se que entre as 75 amostras analisadas, 35 foram positivas pelo isolamento e identificação bacteriológica, dentre as quais 30 também foram positivas pela PCR. Das 40 amostras negativas pelo isolamento e identificação bacteriológica, 11 foram positivas pela PCR-ITS1.

As amostras negativas pelo isolamento e identificação bacteriológica eram provenientes de canis com histórico de brucelose canina. Provavelmente, as amostras negativas por isolamento e positivas por PCR foram obtidas de animais em estágio inicial da infecção, onde não é possível a detecção de *Brucella* pelo isolamento e identificação bacteriológica devido a pouca quantidade de organismos viáveis, ou pelo fato de ocorrência de organismos não viáveis na amostra (CARMICHAEL e SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

Um outro fato que deve ser observado é que o isolamento e identificação bacteriológica foram direcionados para a detecção de *B. canis*. Isto pode explicar os

resultados das PCR-ITS1 positivas frente aos resultados negativos do isolamento e identificação bacteriológica, uma vez que outras brucelas (principalmente *B. abortus*) poderiam estar presentes nas amostras clínicas.

Pelo teste de significância, a concordância no mesmo indivíduo demonstra a não independência entre a PCR-ITS1 e o isolamento e identificação bacteriológica, enquanto, pelo teste McNemar, não parece haver diferença significativa entre as proporções de positividade, independentemente de concordância dos resultados, para um mesmo indivíduo. O intervalo de confiança 95% da diferença entre as positivities está compreendido entre -2% e 18% em favor da PCR-ITS1.

O valor de *kappa* (0,576) classifica a concordância entre os métodos avaliados como moderada. Em conjunto, as análises estatísticas parecem indicar que a diferença de positividade entre as provas seja em favor da PCR. De fato, um número considerável de indivíduos negativos pelo isolamento bacteriológico foram classificados como positivos pelo método molecular (n=11).

Porém, o estreitamento do intervalo de confiança da diferença entre positivities, bem como a validação da PCR-ITS1 para determinação de sua sensibilidade e especificidade diagnósticas devem ser possíveis assim que um número superior de amostras seja avaliado.

A capacidade de detecção dos três pares de *primers* foi verificada frente às seis espécies de *Brucella* e seus biovars sendo que para os três pares de *primers* houve amplificação das bandas esperadas.

Nesse sentido, a PCR-ITS1 ora desenvolvida pode constituir-se uma alternativa ao isolamento e identificação bacteriológica, o método direto mais utilizado na atualidade para o diagnóstico da brucelose em cães. Com efeito, a PCR-ITS1 pode ser concluída em apenas dois dias, prescinde da viabilidade do agente

presente na amostra e é menos suscetível aos inconvenientes gerados pela contaminação da amostra durante a colheita (CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

7 CONCLUSÕES

- Todas as PCRs definidas neste trabalho são apropriadas para a detecção de *Brucella* spp. em cultura pura.
- A PCR-BP26 e a PCR-ITS2, na forma com que foram definidas, não se prestam para o emprego na detecção de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados.
- A PCR-ITS1, em virtude de seu desempenho frente ao cultivo microbiológico, mostrou-se eficaz e adequada para ser empregada no auxílio do diagnóstico da brucelose em cães.
- As concentrações de DNA total obtidas com o protocolo desenvolvido neste trabalho para a extração de 1mL de sangue não parecem afetar o desempenho da PCR para a detecção de seqüências gênicas de *Brucella* spp.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: O.P.S., 2001. 398 p.
- AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis – A Review of the Literature. **Clinical Laboratory**, v.49, p.487-505, 2003.
- ALMEIDA, A. C.; MENESES, A. M.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; LOIOLA, C. F.; MARINOVICK, C.; PEREIRA, P. A. S. Soroprevalência de brucelose canina na cidade de Alfenas, MG. Dados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 358-360, 2001.
- ALTON, G. G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 12, p. 551-557, 1978.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1988. 109 p.
- AMIN, A. S.; HAMDY, M. E.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 37-44, 2001.
- AZEVEDO S. S.; BATISTA, C. de S. A.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO I. J. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 499-500, out./dez., 2003.
- AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P. S.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 156-160, out./dez. 2003.
- 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, n. 2, p. 286-289, 1982.
- BAILY, G. G., KRAHN, J. B., DRASAR, B. S., STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, aug., 1992.
- BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1990. p. 591-600.

BOEBEL, F. W.; EHRENFORD, F. A.; BROWN, G. M.; ANGUS, R. D.; THOEN, C. O. Agglutinins to *Brucella canis* in stray dogs from certain counties in Illinois and Wisconsin. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 3, p. 276-277, 1979.

BOSU, W. T. K., PRESCOTT, J. F. A serological survey of dogs for *Brucella canis* in Southwestern Ontário. **Canadian Veterinary Journal**, v. 21, p. 198-200, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v. 30, p. 39-50, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Diagnóstico de Saúde Animal. c.v. 1977 p.525-602.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Informações sobre o PNCEBT**. Brasília, 2001. Acesso em 10 maio 2004. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>.

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

BRICKER, B. J., HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, Nov., 1994.

BRICKER, B. J. Characterization of the three ribosomal RNA operons *rrnA*, *rrnB*, and *rrnC*, from *Brucella melitensis*. **Gene**, v.255, n. 1, p. 117-126, 2000.

CALDAS, A. D.; OLIVEIRA, JR, B. S.; CASTRO, A. F. P. Tipificação de amostras de *Brucella suis* isoladas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 30, p. 153-157, 1963.

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

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, n. 4, p.579-592, 1968.

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

CARMICHAEL, L. E.; JOURBERT, J. C. A rapid slide agglutination test the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. **Cornell Veterinarian**, v. 77, n. 1, p. 3-12, 1987.

CARMICHAEL, L. E.; JOURBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **Cornell Veterinarian**, v. 78, n, 1, p. 63-73, 1988.

CARMICHAEL, E. L.; 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. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. **Developments in Biological Standardization**, v. 56, p. 371-383, 1984.

CASANAS, M. C.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; RODRIGUEZ-TORRES, A.; ORDUNA, A.; COLMENERO, J. D.; MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 127-131, 2001.

CASTRO, D. Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo IESA em Minas Gerais 1980. **Boletim IESA** v. 1, n. 1-12, 1982.

ÇETINKAYA, B.; ÖNGÖR, H.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; KALENDER, H.; ERGOGAN, H. M. Detecton of *Brucella* sepecies DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. **Veterinary Record**, v. 144, p. 239-240, 1999.

CIESLAK, T. J.; ROBB, M. L.; DRABICK, C. J.; FISCHER, G. W. Catheter-associated sepsis caused by *Ochrobactrum anthropi*: report of a case and review of related nonfermentative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 902-907, 1992.

COCHRAN, W. G. Some methods for strengthening the common X^2 tests. **Biometrcs**, v. 10, p. 417-451, 1954.

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

CORBEL, M. J.; STUART, F. A.; BREWER, R. A.; Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. **Developments in Biological Standartization**, v. 56, p. 341-348, 1984.

CÔRTES, V. A.; OLIVEIRA, M. C. G.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo – Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

COSTA, E. O.; CURY, R.; ROCHA, U. F. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos *Bubalus bubalis* (linnaeus 1975) no estado de Goiás. Inquérito sorológico. **Biológico**, São Paulo, v. 39, p. 162-164, 1973.

CURRIER, R. W.; RAITHEL, W. F.; MARTIN, R. J.; POTTER, M. E. Canine brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 132-133, 1982.

DEL AMO, A.; VENTURINI, M. C.; LORENZO, C. D.; MÓRTOLA, E.; RUAGER, J. Brucelosis en un canino macho. **Veterinaria Argentina**, v. 11, n. 101, p. 28-30, 1995.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FEKETE, A.; BANTLE J. A.; HALLING, S. M.; SANBORN, M. R. Rapid, sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n. 1, p. 31-34, 1990.

FEKETE, A.; BANTLE, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, v. 4, p. 79-83, 1992.

FLORES-CASTRO R.; SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. **Cornell Veterinarian**, v. 66, n. 3, p. 347-352, 1976.

FOSTER, G.; MAC MILLAN, A. P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H. M. M.; CLOECKAERT, A.; REID, R. J.; BREW, S.; PATTERSON, I. A.; A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 563-580, 2002.

FOX, K. F.; FOX, A.; NAGPAL, M.; STEINBERG, P.; HEROUX, K. Identification of *Brucella* by Ribosomal-Spacer-Region PCR and Differentiation of *Brucella canis* from Other *Brucella* spp. Pathogenic for Humans by Carbohydrate Profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3217-3222, 1998.

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

GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; STAAK, C.; PROTZ, D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Veterinary Research**, v. 142, n. 19, p. 512-514, 1998.

GALPHIN, S. P. A serologic survey for *Brucella canis* in dogs on a military base. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 8, p. 728-729, 1977.

GARCIA-CARRILLO, C. La brucelosis de los animales en America y su relacion con la infección humana. Paris: Office International des Epizooties, 1987 Paris, p. 43-70.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. **Cornell Veterinarian**, v. 68, n. 4, p. 530-543, 1978.

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

GERMANO, P. M. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ISHIZUKA, M. M. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas – SP, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 1987.

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, 1977.

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

GODOY, A. M.; PERES, J. N.; BARG, L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 29, n. 1, p. 35-42, 1977.

GRANSDEN, W. R.; EYKYN, S. J. Seven cases of bacteremia due to *Ochrobactrum anthropi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 1068-1069, 1992.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; SOARES, H. C.; BASTOS, C. D.; CANTO, S. P.; BRUM, M.; ROSSI, A. C.; CORBELLINI, L. G. *Brucella canis*: isolamento em um cão com epididimite e orquite – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 18, p. 17-20, 1999.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2 ed Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, 934 p.

GREENE, C. E.; GEORGE, L. W. Canine brucellosis in: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 646-662, 1984.

GUARINO, A.; SERPE, L.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **The Veterinary Record**, v. 147, n. 22, p. 634-636, 2000.

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

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.

HAMDY, M. E.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **Veterinary Journal**, v. 163, n. 3, p. 299-305, 2002.

HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. By Using the Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58 n. 6, p. 2099-2101, 1992.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inferences. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-455, 1991.

HIPÓLITO, O. M. G.; FREITAS & FIGUEIREDO J. B. Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos. 4ª edição, ver. Ampl. Edições Melhoramentos, S. Paulo, 495p., 1965.

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

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

JUMAS-BILAK, E.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 99-106, 1998.

KEID L. B. **Diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia pela polimerase.** 2001. 96 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

KEID, L. B.; MORAES, Z. M.; MELVILLE, P. A.; VASCONCELLOS, S. A. Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em canis do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 42, 2002.

KREADER, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1102-1106, 1996.

LARSSON, M. H. M. A. Pesquisa de aglutinina anti-*Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, n. 13, p. 158-161, 1986.

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.; MIRANDOLA, R. M. S.; YASUDA, P. H.; GRUTOLLA, G. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. **International Journal of Zoonoses**, v. 8, p. 85-90, 1981.

LEAL-KLEVEZAS, D. S., MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I. O., LÓPEZ-MERINO, A., MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. From Blood and Milk of Infected Animals. **Journal of Clinical Microbiology** v.33(12), p.3087-3090, 1995.

LEAL-KLEVEZAS, D. S., R. BARBABOSA-PLIEGO, M. FLORES-TRUJILLO, A. LÓPEZ-MERINO, J. P. MARTÍNEZ-SORIANO, 1999, *apud* LEAL-KLEVEZAS, D. S., MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I. O. *et al.* Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 91-97, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J. P. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. **Archives of Medical Research**, v. 26, n. 3, p. 263-267, 1995.

LEYLA, G.; KADRI, G.; ÜMRAN, O. K. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 53-61, 2003.

LOPAREV, V. N.; CARTAS, M. A.; MONKEN, C. E.; VELPANDI, A.; SRINIVASAN, A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. **Journal of Virological Methods**, v. 34, p. 105-112, 1991.

MAGALHÃES NETO, A.; DA CRUZ, F. W.; SANTOS, A. F.; GIL-TURNER, C.; ALEIXO, J. A. G.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GURVITZ, R. Prevalência de humanos e caninos reatores à *Brucella rugosa* no município de Pelotas, RS. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11, 1992, Gramado. **Anais**: p. 92.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, p. 75-79, 1996.

MAGALHÃES NETO, A.; LAER, A. E. V.; HERES, T.S.; ANASTÁCIO, L. M. Estudo Sorológico e Microbiológico da *Brucella ovis* em um rebanho ovino no RS In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu-PR. **Revista do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Rio de Janeiro, RJ: Armazém das Letras, 2001. p. 173.

MAIA, G. R.; ROSSI, C. R. S.; ABBADIA, E.; VIEIRA, D. K.; MORAES, I. A. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói, RJ. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 425-427, 1999.

MANFREDI, R.; NANETTI, A.; FERRI, M.; CHIODO, F. Nosocomial sepsis due to *Ochrobactrum anthropi* in HIV positive patients: two case reports. **Infez Med**, v. 7, n. 2, p.119-124, 1999.

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J. M.; MARIN, C. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1-2, p. 65-72, 2003.

MATAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDELNOOR, A. M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 477-478, 1996.

MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTIN, M.; CASAL, J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 257-259, 1994.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions of percentages. **Psychometrika**, v. 12, p. 153-157, 1947.

MEGID, J.; BRITO, A. F.; MORAES, C. C. G.; FAVA, N.; AGOTTANI, J. Epidemiological assessment of canine brucellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 439-440, 1999.

MELO, S. M. B.; NASCIMENTO, R. M.; AGUIAR, P. H. P.; FREIRE, S. M. F. Avaliação sorológica em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo – Camaçari – Bahia. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 19, n. 1, p. 119-127, 1997.

MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; JUMAS-BILAK, E.; GUIGUE-TALET, P.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 10, p. 3244-3249, 1997.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; CARVALHO, M. Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 121, p. 45-49, 2001.

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

MOORE, J. A.; GUPTA, B. N. Epizootiology diagnosis, and control of *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1737-1742, 1970.

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

MORAES, C. C. G.; MEGID, J.; SOUZA, L. C.; CROCCI, A. J. Prevalência da brucelose canina na microrregião da serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J. D. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2443-2446, 1998

MUNFORD, R. S.; WEAVER, R. E.; PATTON, C.; FREELEY, J. C.; FELDMAN, R. A. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemiologic study of two cases. **Journal of the American Medical Association**, v. 231, n. 12, p. 1267-1269, 1975.

MYERS, D. M.; VARELA-DIAZ, 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. **Journal of Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1974.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 147-151, 2002.

NAVARRO, E.; FERNANDEZ, J. A.; ESCRIBANO, J.; SOLERA, J. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1654-1655, 1999.

NIELSEN, K; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL D'ÉPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Bovine brucellosis**, 4. ed. Paris, 2000 p. 276-291.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL D'ÉPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Ovine brucellosis**, 4. ed. Paris, 2000 p. 276-291.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 1, p. 113-123, 1993.

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.

PILLAI, M. T.; NEDUNCHELLIAN, S.; RAGHAVAN, N. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of dogs in Madras. **Indian Veterinary Journal**, v. 68, n. 5, p. 399-401, 1991.

POESTER, F. P. Isolamento de *Brucella abortus* e *suis* respectivamente em bovinos e suínos no RS e SC. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4., 1977.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; MORATA P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; COLMENERO, J. D. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2927-2930, 1997.

QUINIM, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Medical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. p. 261-267.

RAMOS, E. T.; ALBITE, F. C.; GIANNOULAKIS, M. K. THIESEN, S. V.; POESTER, F. P.; PIRES NETO, J. A. S., Epididimite ovina em Santana do Livramento: exames sorológicos e bacteriológicos. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 11., 1992, Gramado, pp.90, 1992.

RIECKE, J. A.; RHOADES, H. E. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 6, p. 583-584, 1975.

RIJPENS, N. P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; ROSSAU, R.; HERMAN, L. M. F. Direct detection of *Brucella* ssp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1683-1688, 1996.

ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 615-617, 1995a.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.

ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, M. J.; DIAZ, R.; BLASCO, J. M.; LOPEZ-GOÑI, I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk sample for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3198-3200, 1995b.

ROSSETTI, O. L.; ARESE, A. I.; BOSCHIROLI, M. L.; CRAVER, S. L. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-Kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 165-169, 1996.

ROUSSEAU, P. *Brucella canis* infection in a woman with fever of unknown origin. **Postgraduate Medicine**, v. 78, n. 5, p. 249, 253-254, 257, 1985.

ROXO, E.; PINHEIRO, S. R.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, J. A. C.; 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, 1990.

RUMLEY, R. L.; CHAPMAN, S. W. *Brucella canis*: an infectious cause of prolonged fever of undetermined origin. **Southern Medical Journal**, v. 79, n. 5, p. 626-628, 1986.

RYCHLIK, W. & RHOADS, R. E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. **Nucleic Acid Res.**, 17: 8543 – 51, 1989.

- SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. A survey of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo Area. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, p. 75-80, 1978.
- SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 39, p. 181-185, 1977.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDOVAL, L. A.; RIBEIRO, L. O. C.; AMARAL, L. B. S.; FEITOSA, M. H.; BAZAN, J. M. Incidência da brucelose canina na cidade de São Paulo. **O Biológico**, v. 42, n. 32, p. 128-132, 1976.
- SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para *Brucella* em búfalos no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 35-39, 1961.
- SCHOEB, T. R.; MORTON, R. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 5, p. 598-600, 1978.
- SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 41, n. 6, p. 607-616, 1979.
- SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N. Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, n. 3, p. 353-355, 1978.
- SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 313-317, 1999.
- SEWELL, D. L. Laboratory-associated infections and biosafety. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 389-405, 1995.
- SMEAK, D. D.; OLMSTEAD, M. L.; HOHN, R. B. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 8, p. 986-990, 1987.
- TAYLOR, D. J. Serological evidence for the presence of *Brucella canis* infection in dogs in Britain. **Veterinary Record**, v. 106, v. 5, p. 102-104, 1980.
- THOMPSON, C. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 6, p. 583-584, 1975.
- VARGAS, A. C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; POESTER, F. Brucelose canina: relato de caso. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 305-308, 1996.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZALEZ, D.; ZHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYON, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3210-3218, 2000.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LÓPEZ-GONI, I.; LEIVA, J.; DIAZ, R.; MORIYON, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **Int J Sys Bacteriol**, v.48, p.749-768, 1998.

VEMULAPALLI, R.; MCQUISTON, J. R.; SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S. M.; AND BOYLE, S. M. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 760-764, 1999.

VERGER, J. M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 292-295, 1985.

WALLACH, J. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; BALDI, P. C.; FOSSATI, C. A. human infection with M- strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 10, n. 1, p. 146-148, 2004.

WOOLEY, R. E.; HITCHCOCK, P. L.; BLUE, J. L.; NEUMAN, M. A.; BROWN, J.; SHOTTS, E. B. Isolation of *Brucella canis* from a dog seronegative for brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 4, p. 387-388, 1978.

ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1661-1664, 2001.

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