LARA BORGES KEID

**Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em
cães naturalmente infectados**

Tese 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 Doutor em Medicina
Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2006

LARA BORGES KEID

**Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em
cães naturalmente infectados**

Tese 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 Doutor em Medicina
Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2006

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

8230
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
30/3/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1671
FMVZ

Keid, Lara Borges

Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados / Lara Borges Keid. – São Paulo : L. B. Keid, 2006.
134 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Cães. 2. Brucelose canina. 3. Reação em cadeia por polimerase. 4. Cultivo microbiológico. 5. Sorodiagnóstico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de métodos diretos e indiretos no diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados", Protocolo nº495/2004, utilizando 150 cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of direct and indirect methods for the diagnosis of brucellosis in naturally infected dogs" protocol number 495/2004, utilizing 150 dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, 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 "ad referendum", meeting.

São Paulo, 11 de agosto de 2005

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: KEID, Lara Borges

Título: Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Vera e Edson

Tudo o que consegui foi através dos seus ensinamentos, dos seus esforços e de seu amor incondicional.

À minha irmã Fernanda

Por todo o incentivo e carinho

Ao Rodrigo

Por toda a paz e felicidade que você trouxe para minha vida. Meu eterno agradecimento e amor

Ao meu tio Fernando (In memoriam)

Presença forte em minha vida, um grande exemplo de alegria e perseverança

Agradecimentos

A Deus, por ter guiado meus passos, aliviado minhas angústias e fortalecido minhas esperanças;

Ao meu orientador, Prof. Leonardo José Richtzenhain, pela confiança em meu trabalho e pelo aprendizado, toda minha gratidão e admiração;

Ao Prof. Sílvio Arruda Vasconcellos, pela importante participação em minha formação;

À Prof. Jane Megid pela ajuda na realização dos testes sorológicos;

Aos veterinários Dr. Gilberto Mamoru Baba, Dra. Maria Beatriz Zerwes e Dra. Simone Gonçalves pelo auxílio na colheita das amostras;

Às amigas Vanessa Salgado e Daniela Pontes Chiebao pelo auxílio na realização deste trabalho e pelas boas horas de convivência;

À amiga Adriana Cortez, pelo convívio, apoio e sugestões;

À Zenaide e Gisele pela amizade, paciência e por toda a ajuda oferecida no decorrer destes anos;

A todos os proprietários dos canis que permitiram a realização deste trabalho;

A todos os cães que me auxiliaram na realização deste trabalho, graças a eles obtivemos estas informações;

A todos os amigos e colegas de pós-graduação do VPS, pelos agradáveis momentos de convivência;

*Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo e a todos os seus professores;*

A(o)s secretária(o)s do VPS: Virginia, Cristina, Danival e Tânia;

Às secretárias de pós-graduação da FMVZ-USP: Dayse, Cláudia e Joana;

A todos os funcionários do VPS;

*À equipe da Biblioteca da FMVZ-USP, especialmente à Elza Faquim pelas
orientações para confecção deste trabalho;*

*Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de doutorado e financiamento dos
gastos do projeto de pesquisa*

*O teu trabalho é o cântico
De tua própria vida.*

*Imprime nele onde estiveres
A nota azul de teu amor.*

*Não busques a tarefa que te cabe
Com a tristeza do escravo.*

*O teu trabalho é a oficina
Em que podes forjar a tua própria
luz.*

(Chico Xavier)

RESUMO

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados.** [Evaluation of direct and indirect methods of diagnosis for brucellosis in naturally infected dogs]. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Foram comparados procedimentos laboratoriais diretos e indiretos aplicados ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*. Foram examinados 196 cães, os quais foram classificados em infectados, suspeitos e não infectados, de acordo com resultados obtidos no cultivo microbiológico em amostras de sangue, sêmen e *swab* vaginal, no exame clínico e de acordo com dados epidemiológicos. Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram correlacionados com os resultados dos exames clínicos. As técnicas laboratoriais empregadas foram soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação rápida com emprego do 2-mercaptoetanol (SAR-2ME), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue, sêmen e *swab* vaginal. Foram observados 41,83% de positivos pela SAR, 14,28% pela SAR-2ME, 28,14% pela IDGA, 32,14% pela hemocultura, 19,6% pelo cultivo microbiológico de sêmen, 4,82% pelo cultivo microbiológico de *swab* vaginal, 33,16% pela PCR em sangue, 33,33% pela PCR em sêmen e 26,89% pela PCR em *swab* vaginal. Os valores de sensibilidade das provas de SAR, SAR-2ME, IDGA, PCR em sangue e PCR em *swab* vaginal foram respectivamente de 81,25%; 42,18%; 75%; 89,06% e 54%. A especificidade dos métodos de SAR, SAR-2ME, IDGA, PCR em sangue e PCR em *swab* vaginal foram respectivamente de 81,25%; 100%; 100%; 97,21% e 97,14%. Nos cães machos, as proporções de resultados positivos diagnosticados pelo cultivo

microbiológico de sêmen foram semelhantes às observadas pelos demais métodos de diagnóstico utilizados. As proporções de resultados positivos obtidos pelas técnicas de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, PCR em sangue e cultivo de *swab* vaginal foram maiores dentre os animais que apresentaram sinais clínicos sugestivos de brucelose. Não houve associação entre a presença de sinais clínicos de brucelose e resultados positivos pelo cultivo microbiológico de sêmen e PCR em amostras de sêmen e *swab* vaginal.

Palavras-chave: Cães. Brucelose canina. Reação em cadeia pela polimerase. Cultivo microbiológico. Sorodíagnóstico

ABSTRACT

KEID, L. B. Evaluation of direct and indirect methods of diagnosis of brucellosis in naturally infected dogs [Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados]. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Nine laboratory tests used for *Brucella canis* infection diagnosis in 196 dogs were evaluated: rapid slide agglutination test (RSAT), 2-mercaptoetanol rapid slide agglutination test (2ME-RSAT), agar gel immunodiffusion test (AGID), microbiological culture of blood, semen and vaginal swab and PCR in blood, semen and vaginal swab samples. The results of the laboratorial tests used were compared to the results of clinical examination. A total of 41,83% of positives were detected by rapid slide agglutination test, 14,28% by 2-mercaptoetanol rapid slide agglutination test, 28,14% by agar gel immunodiffusion test, 32,14% by blood culture, 19,6% by culture of semen, 4,82% by vaginal swab culture, 33,16% by PCR in blood samples, 33,33% by PCR in semen and 26,89% by PCR in vaginal swab samples. The sensitivity of RSAT, 2ME-RSAT, IDGA, PCR in blood and vaginal swab samples was respectively 81,25%; 42,18%; 75%; 89,06% and 54%. The specificity of RSAT, 2ME-RSAT, IDGA, PCR in blood and vaginal swab samples was respectively: 81,25%; 100%; 100%; 97,21% e 97,14%. In male dogs, the proportion of positive results detected by microbiological culture of semen was similar to the proportion of positive results detected by RSAT, AGID and blood culture, but the proportion was lower than that detected by PCR in semen. A higher proportion of positives were detected by RSAT, 2ME-RSAT, AGID, blood culture, PCR in blood samples and culture of vaginal swab, in animals presenting

clinical signs of brucellosis. No association was observed between the presence of clinical signs of brucellosis and positive results by culture of sêmen and PCR in semen and vaginal swab samples.

Keywords: Dogs. Canine brucellosis. Polymerase Chain Reaction. Microbiological culture. Serodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura -	Sensibilidade analítica da PCR utilizando os <i>primers</i> ITS66 e ITS279 em amostras de sêmen e <i>swab</i> vaginal experimentalmente contaminadas com DNA de <i>B. canis</i> RM6/66.....	78
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ocorrência da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> em diversas cidades e estados brasileiros de acordo com métodos sorológicos e bacteriológicos de diagnóstico, São Paulo - 2006.....	29
Tabela 2 -	Características bioquímicas das bactérias pertencentes ao gênero <i>Brucella</i> , São Paulo - 2006.....	63
Tabela 3 -	Seqüência dos <i>primers</i> empregados para o diagnóstico de brucelose canina, direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de <i>Brucella</i> , São Paulo - 2006.....	69
Tabela 4 -	Proporção de resultados positivos detectados pelas provas de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, cultivo de sêmen e <i>swab</i> vaginal e PCR em amostras de sangue, sêmen e <i>swab</i> vaginal, aplicadas ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> , São Paulo – 2006.....	79
Tabela 5 -	Avaliação do desempenho das provas de SAR, SAR-2ME, hemocultura, cultivo de sêmen e de <i>swab</i> vaginal e PCR em sangue, sêmen e <i>swab</i> vaginal, comparando os resultados dois a dois, pelos testes de Mc Nemar, Qui-quadrado e Kappa, São Paulo, 2006.....	81
Tabela 6 -	Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de soroaglutinação rápida em placa (SAR), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> , São Paulo - 2006.....	83
Tabela 7 -	Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de soroaglutinação rápida em placa com 2-mercaptoetanol (SAR-2ME), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> , São Paulo – 2006.....	84
Tabela 8 -	Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella</i> , São Paulo - 2006.....	84
Tabela 9 -	Sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de	

	sangue, aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> , São Paulo - 2006.....	85
Tabela 10 -	Sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de <i>swab</i> vaginal, aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por <i>Brucella canis</i> , São Paulo - 2006.....	86
Tabela 11 -	Proporções de cães machos positivos diagnosticados pelos testes de SAR, SAR-2ME, IDGA, cultivo de sangue e sêmen e PCR em sangue e sêmen, em relação à condição clínica, São Paulo – 2006.....	88
Tabela 12 -	Proporções de cadelas positivas diagnosticadas pelos testes de SAR, SAR-2ME, IDGA, cultivo de sangue e <i>swab</i> vaginal e PCR em sangue e <i>swab</i> vaginal, em relação à condição clínica, São Paulo – 2006.....	89
Tabela 13 -	Valores de sensibilidade e especificidade da PCR em amostras de sangue para a detecção de DNA de <i>Brucella</i> spp. em diferentes espécies de hospedeiros e de acordo com diferentes protocolos, São Paulo – 2006.....	101
Tabela 14 -	Resultado do exame clínico, soroaglutinação rápida com e sem 2-mercaptoetanol, imunodifusão em gel de ágar, cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo em cães naturalmente infectados, São Paulo – 2006.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2ME =	2-mercaptoetanol
AAT =	antígeno acidificado tamponado
CTAB =	hexadecyltrimethylammonium bromide
dATP =	desoxi-adenosina trifosfato
dCTP =	desoxi-citosina trifosfato
dGTP =	desoxi-guanosina trifosfato
dTTP =	desoxi-timidina trifosfato
DNA =	ácido desoxirribonucléico
EDTA =	ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA =	ensaio imunoenzimático
fg =	fentograma
g =	grama
g =	gravidade
H ₂ S =	sulfeto de hidrogênio
HCl =	ácido clorídrico
IDGA =	imunodifusão em gel de ágar
IgG =	imunoglobulina G
IgM =	imunoglobulina M
ITS =	internal transcribed sequence
K =	Kappa
KCl =	cloreto de potássio
kDa =	kilodalton
L =	litro
LPS=	lipopolissacarídeos
LS =	Lumazine Synthase
M =	molar (mol por litro)
mg =	miligrama
MgCl ₂ =	cloreto de magnésio
mL =	mililitro
mm =	milímetro
μM =	micromolar

mM =	milimolar
µg =	micrograma
µL =	microlitro
NaCl =	Cloreto de sódio
nm =	nanômetro
Omp31 =	outer membrane protein 31
p/v =	peso por volume
bp =	base pair (pares de bases)
PCR =	reação em cadeia pela polimerase
pg =	picograma
pH =	potencial hidrogeniônico
R-LPS =	lipopolissacarídeo rugoso
RNA =	ácido ribonucléico
rpm =	rotações por minuto
SAL =	prova de soroaglutinação lenta
SAR =	prova de soroaglutinação rápida
SAR-2ME =	soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol
Taq =	<i>Thermus aquaticus</i>
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
TSI =	Triple Sugar Iron
UI =	unidade internacional
V =	volts
X =	vezes
X ² =	Qui quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	ETIOLOGIA.....	25
2.2	IMPORTÂNCIA.....	26
2.3	OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO NO BRASIL.....	28
2.4	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	32
2.5	TRANSMISSÃO.....	37
2.6	DIAGNÓSTICO.....	39
2.6.1	Diagnóstico Sorológico.....	39
2.6.2	Diagnóstico Bacteriológico.....	45
2.6.3	Diagnóstico pela Reação em Cadeia pela Polimerase.....	47
2.7	TRATAMENTO.....	50
2.8	CONTROLE E PREVENÇÃO.....	51
3	OBJETIVOS.....	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1	ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS.....	55
4.2	ANIMAIS.....	55
4.3	ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	56
4.4	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	56
4.4.1	Amostras de Sangue e Soro.....	56
4.4.2	Amostras de Trato Reprodutivo.....	57
4.4.2.1	Amostras de Sêmen.....	57
4.4.2.2	Amostras de <i>Swab</i> Vaginal.....	57
4.5	SORODIAGNÓSTICO.....	58
4.5.1	Prova de Soroaglutinação Rápida (SAR).....	58
4.5.2	Prova de Soroaglutinação Rápida com Emprego do 2-Mercaptoetanol (SAR-2ME).....	59
4.5.3	Prova de Soroaglutinação Rápida com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).....	59

4.5.4	Prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....	60
4.6	CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	61
4.6.1	Isolamento Bacteriano de Amostras de Sangue.....	61
4.6.2	Isolamento Bacteriano de Amostras de Trato Reprodutivo (Sêmen e <i>Swab</i> Vaginal).....	62
4.6.3	Identificação Bacteriana.....	62
4.6.3.1	Características Morfológicas.....	62
4.6.3.2	Características Bioquímicas.....	63
4.7	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	64
4.7.1	Extração de Ácidos Nucléicos de Colônias Bacterianas e Amostras Clínicas.....	64
4.7.1.1	Extração de Ácidos Nucléicos de Bactérias Oriundas de Cultura Pura.....	64
4.7.1.2	Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de Sangue Periférico Total de Cães	66
4.7.1.3	Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de Sêmen Canino.....	67
4.7.1.4	Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de <i>Swab</i> Vaginal Canino.....	68
4.7.2	Reação de Amplificação de Ácidos Nucléicos.....	69
4.7.2.1	Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>Primers</i>) Empregados.....	69
4.7.2.2	Condições de Amplificação de Ácidos Nucléicos.....	70
4.7.2.3	Análise do Produto Amplificado.....	70
4.8.	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS <i>PRIMERS</i> ITS66 E ITS279 EM AMOSTRAS DE SÊMEN E <i>SWAB</i> VAGINAL EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS.....	71
4.9	DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS <i>PRIMERS</i>.....	72
4.10	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADOS.....	72
4.10.1	Avaliação do Desempenho das Provas de Diagnóstico Empregadas Comparando-as Duas a Duas.....	73
4.10.2	Definição do <i>Gold Standard</i> e Cálculo da Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica das Provas Laboratoriais	

	Empregadas.	74
4.10.2.1	Sensibilidade e Especificidade das Provas de Soraglutinação Rápida (SAR), Soroaglutinação Rápida com 2-Mercaptoetanol (SAR-2ME) e PCR em Amostras de Sangue.....	74
4.10.2.2	Sensibilidade e Especificidade da Técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).....	75
4.10.2.3	Sensibilidade e Especificidade da PCR em Amostras de <i>Swab</i> Vaginal	76
4.10.2.4	Avaliação do Desempenho da PCR em Amostras de Sêmen	76
5	RESULTADOS.....	77
5.1	SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS <i>PRIMERS</i> ITS66 E ITS279 EM AMOSTRAS DE SÊMEN E SWAB VAGINAL.....	77
5.2.	ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS <i>PRIMERS</i> ITS66 E ITS279.....	79
5.3	PROPORÇÕES DE POSITIVOS DETECTADA PELOS MÉTODOS LABORATORIAIS EMPREGADOS.....	79
5.4	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS, COMPARANDO-AS DUAS A DUAS.....	80
5.5	CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DAS PROVAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS.....	83
5.5.1	Cálculo da Sensibilidade e Especificidade das Provas Sorológicas (SAR, SAR-2ME e IDGA).....	83
5.5.2	Cálculo da Sensibilidade e Especificidade da PCR Aplicada em Amostras de Sangue e <i>Swab</i> Vaginal de Cães.....	85
5.5.3.	Avaliação do Desempenho da PCR Aplicada em Amostras de Sêmen Canino.....	87
5.6	AVALIAÇÃO DAS PROPORÇÕES DE POSITIVOS DIAGNOSTICADAS PELOS TESTES LABORATORIAIS UTILIZADOS NOS CÃES COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS DE BRUCELOSE	87
6	DISCUSSÃO.....	90

6.1	SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA PCR.....	
6.2	ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DA PCR.....	92
6.3	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DOS TESTES SOROLÓGICOS.....	93
6.4	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DA PCR APLICADA EM AMOSTRAS DE SANGUE.....	99
6.5	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DA PCR APLICADA EM AMOSTRAS DE <i>SWAB</i> VAGINAL.....	102
6.6	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR EM AMOSTRAS DE SÊMEN	107
6.7	AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESULTADOS POSITIVOS NOS TESTES LABORATORIAIS E PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS DE BRUCELOSE.....	110
7	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO	129

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A brucelose causada pela *Brucella canis* constitui uma infecção sistêmica, caracterizada por bacteremia prolongada e caráter zoonótico que acomete os cães. A infecção por *B. canis* é responsável por problemas reprodutivos, como abortamento, falhas de concepção, orquite, epididimite e infertilidade. Sinais clínicos não reprodutivos podem ser observados associados aos tecidos ricos em células reticuloendoteliais e infecções assintomáticas também podem ser observadas.

A brucelose canina apresenta importância devido à sua elevada frequência de ocorrência, principalmente nos canis comerciais. Uma vez que a infecção se estabelece em populações confinadas, sua disseminação ocorre rapidamente acometendo um elevado número de animais e causando problemas econômicos, decorrentes das perdas reprodutivas acarretadas. Além disso, em função do estreito convívio estabelecido entre os cães e o homem, apresenta importância do ponto de vista da saúde pública.

O diagnóstico laboratorial da brucelose canina pode ser baseado em métodos diretos e indiretos e deve ser realizado sempre que sinais clínicos ou evidências epidemiológicas sugestivas de brucelose forem observados.

O diagnóstico laboratorial constitui ferramenta fundamental para o conhecimento da prevalência da brucelose e para a prevenção e o controle da infecção nas criações de cães. Em canis acometidos pela brucelose, a rápida identificação dos animais infectados é necessária para conter a disseminação da infecção. Além disso, a realização de testes laboratoriais nos animais a serem introduzidos em populações confinadas constitui medida preventiva indispensável.

Dessa maneira, o presente trabalho apresenta como objetivos comparar o desempenho de métodos laboratoriais diretos e indiretos disponíveis para o diagnóstico

da brucelose canina, na tentativa de estabelecer um protocolo de diagnóstico que permita a rápida detecção dos animais infectados, com aplicabilidade tanto em populações caninas confinadas como em casos individuais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Brucella* é constituído por bactérias intracelulares facultativas, com seis espécies reconhecidas, cada uma delas acometendo um hospedeiro preferencial. As espécies de *Brucella* são identificadas de acordo com o hospedeiro preferencial, características morfológicas, propriedades metabólicas, sorotipagem e fagotipagem (ALTON et al., 1976).

A *Brucella melitensis* é responsável pela brucelose ovina e caprina, sendo considerada a mais patogênica das seis espécies, provocando infecções severas em humanos; a *B. abortus* é o principal agente da brucelose bovina e bubalina e apresenta ampla distribuição mundial; a *B. suis* acomete principalmente os suínos enquanto a *B. ovis* e *B. canis* são responsáveis respectivamente pela epididimite nos ovinos e pela brucelose canina. A *B. neotomae* foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida*. Algumas espécies como a *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* são ainda divididas em biótipos (ACHA; SZYFRES, 2001; ALTON et al., 1976).

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

A brucelose canina causada pela *Brucella canis* foi descrita por Carmichael, em 1966, Estados Unidos da América (EUA) durante episódios de abortamento em canis da raça Beagle em diversos estados americanos. De tecidos fetais e placentários foi isolado um microrganismo cujas características de cultivo, bioquímicas e sorológicas indicavam que esse organismo pertencia ao gênero *Brucella* (CARMICHAEL, 1966; MOORE; BENNET, 1967). Posteriormente, verificou-se que o microrganismo responsável por abortamentos e

infertilidade em cães apresentava características distintas das demais espécies do gênero *Brucella*, tendo sido designado *Brucella canis* (CARMICHAEL; BRUNNER, 1968; JONES et al., 1968).

A *B. canis* é uma bactéria Gram-negativa na forma de coco-bastonete, aeróbica, de crescimento lento, não móvel e não formadora de esporos. É bioquimicamente semelhante à *B. suis*, sendo produtora de urease, H₂S negativa, redutora de nitratos, não fermentadora e oxidase positiva (ALTON et al., 1976; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; BRUNNER, 1968; JONES et al., 1968).

2.2 IMPORTÂNCIA

O caráter zoonótico da infecção foi constatado em 1969, quando do registro de infecções em seres humanos decorrentes de acidentes em laboratório (MORISSET; SPINK, 1969). Casos de infecção humana por *B. canis* vêm desde então sendo descritos, tanto adquiridas em laboratórios como doença ocupacional (GODOY et al., 1979; WALLACH et al., 2004), quanto decorrentes do estreito convívio estabelecido entre cães e o homem (BLANKENSHIP; SANFORD, 1975; LUCERO et al., 2005a,b; MUNFORD et al., 1975; ROXO et al., 1990; RUMLEY; CHAPMAN, 1986; SWENSON; CARMICHAEL; CUNDY, 1972). O contato com cadelas que abortaram constitui a forma de contágio mais freqüente, no entanto há alguns relatos de exposição relacionada a cães machos e inclusive alguns casos nos quais não foi possível a identificação da fonte de infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1990; POLT et al., 1982; ROUSSEAU, 1985).

Existem relatos de infecção humana baseados tanto em evidências sorológicas (BARG; GODOY; GRANDI, 1978; BARG; GODOY; PERES, 1977; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; LARSSON, 1980; LUCERO et al., 2005a,b; MAGALHÃES-NETO et al.,

1992; ROXO et al., 1990; ROUSSEAU, 1985) quanto bacteriológicas (GODOY et al., 1979; LUCERO et al., 2005a,b; MUNFORD et al., 1975; ROUSSEAU, 1985; WALLACH et al., 2004).

O homem é considerado relativamente resistente à infecção por *B. canis*, quando comparado às infecções provocadas pelas três espécies clássicas de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*). Aparentemente é necessária a exposição a um grande número de microrganismos para o estabelecimento da infecção e ocorrência de sinais clínicos. Alguns pacientes apresentam-se assintomáticos apesar de evidências sorológicas da infecção (BARG; GODOY; PERES, 1977; CARMICHAEL; GREENE, 1990; HARTIGAN, 1997; LARSSON, 1980; LEWIS; ANDERSON, 1973; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; MOORE, 1969). É importante ressaltar que métodos de diagnósticos padronizados para a utilização em humanos não são disponíveis, o que pode subestimar o número de casos ocorridos.

Nos humanos, os principais sinais clínicos observados são: febre prolongada (CARMICHAEL; GREENE, 1990;), fadiga (CARMICHAEL; GREENE, 1990; ROXO et al., 1990), aumento do volume dos linfonodos (CARMICHAEL; GREENE, 1990, tosse, dores articulares (GODOY et al., 1979), perda de peso (CARMICHAEL; GREENE, 1990; MUNFORD et al., 1975), cefaléia, náuseas, sudorese noturna (CARMICHAEL, 1990; ROXO et al., 1990), mialgia e depressão (ROXO et al., 1990). Endocardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais (CARMICHAEL; GREENE, 1990) são complicações mais raramente observadas (HARTIGAN, 1997).

Além da importância do ponto de vista de saúde pública, os prejuízos atribuídos à presença de *B. canis* em criações de cães também devem ser considerados. Os prejuízos são consequência das perdas econômicas derivadas de abortamento e infertilidade, assim como de perda de patrimônio genético decorrente da infecção em animais de alto valor genético. (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; JONES; EMERSON, 1984; KEID et al., 2004a; KEID

a,b; MYERS; VARELA-DIAZ, 1980; MOORE; GUPTA; CONNER, 1968; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; RHOADES; MESFIN, 1980).

A prevenção da brucelose em criações de cães deve ser enfatizada, pois a disseminação da doença é rápida (JONES; EMERSON, 1984; KEID et al., 2004a,b; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972) e a prevenção é a única forma de controle uma vez que o tratamento curativo é difícil, oneroso e pouco eficiente (JONES; EMERSON, 1984; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972).

2.3 OCORRÊNCIA BRUCELOSE CANINA NO BRASIL

Dados sobre a ocorrência da brucelose canina causada por *B. canis* no Brasil são pontuais e em sua maioria baseados em exames sorológicos. Observa-se uma ocorrência variando entre 1,32% e 72,7%, de acordo com a região, a população de cães examinada e o teste de diagnóstico empregado (tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em diversas cidades e estados brasileiros de acordo com métodos sorológicos e/ou bacteriológicos de diagnóstico, São Paulo – 2006

AUTORES	LOCAL	NÚMERO ANIMAIS	PROCEDÊNCIA DOS CÃES	POSITIVOS	DIAGNÓSTICO UTILIZADO
Godoy; Peres; Barg, 1977	Belo Horizonte - MG	76	domiciliados e errantes	1 (1,32%)	SAR e SAL
				1 (1,32%)	hemocultura
Sandoval et al., 1976	São Paulo - SP	221	errantes	8 (3,61%)	SAL
Larsson; Costa, 1980	São Paulo - SP	27	canis e errantes	5 (18,51%)	SAL
				3 (11,12%)	hemocultura
Larsson et al., 1981	São Paulo - SP	364	errantes e de canil	30 (8,24%)	SAR
Germano et al., 1987	Campinas - SP	352	domiciliados	19 (5,4%)	SAR-2ME
Cortes et al., 1988	São Paulo - SP	3386	errantes	254 (7,5%)	IDGA
Magalhães-Neto et al., 1992	Pelotas - RS	304	não conhecido	69 (22,7%)	IDGA
Vargas et al., 1996	Uruguaiana - RS	12	canil	8 (72,7%)	IDGA
				2 (16,6%)	cultivo de placenta e fetos
Melo et al., 1997	Camaçari - BA	108	não conhecido	40 (37%)	IDGA
Maia et al., 1999	Rio de Janeiro e Niterói - RJ	171	não conhecido	44 (25,7%)	IDGA
Megid et al., 1999	Botucatu - SP	151	canis	26 (17,21%)	IDGA
Vieira et al., 2000	Rio de Janeiro - RJ	146	região rural e urbana	28 (19,17%)	IDGA
Mólnar; Mólnar; Carvalho, 2001	Belém - PA	236	residências, abrigos, canis, região rural	107 (45,37%)	IDGA
				91 (38,56%)	FC
				109 (46,14%)	ELISA

Tabela 1 - Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em diversas cidades e estados brasileiros de acordo com métodos sorológicos e bacteriológicos de diagnóstico, São Paulo – 2006

AUTORES	LOCAL	NÚMERO ANIMAIS	PROCEDÊNCIA DOS CÃES	Continuação	
				POSITIVOS	DIAGNÓSTICO UTILIZADO
Moraes I et al., 2002a	Rio de Janeiro - RJ	119	domiciliados	11 (9,2%)	IDGA
Moraes C et al., 2002b	Botucatu - SP	1072	região urbana e rural	19 (1,77%)	SAR
				9 (0,84%)	SAR-2ME
Souza et al., 2002	Belo Horizonte - MG	1368	não conhecido	65 (4,8%)	IDGA
Alves et al., 2003	Patos - PB	274	domiciliados	10 (3,6%)	IDGA
Azevedo et al., 2003	Santana de Parnaíba - SP	410	domiciliados, semi-domiciliados e soltos	39 (9,51%)	IDGA
				15 (3,65%)	IDGA-2ME
				14 (3,41%)	FC
Ferreira et al., 2003	Barra de Guaratiba - RJ	12	canil	7 (58,33%)	IDGA (antígeno externo de <i>B. ovis</i>)
				3 (25%)	IDGA (antígeno interno de <i>B. ovis</i>)
				3 (25%)	IDGA (antígeno externo de <i>B. canis</i>)
				3 (25%)	IDGA (antígeno interno de <i>B. canis</i>)
Marassi; Moraes; Lilienbaum, 2003	Rio de Janeiro - RJ	497	domiciliados	36 (7,4%)	IDGA
Almeida et al., 2004	Alfenas - MG	635	domiciliados	90 (14,2%)	IDGA
Azevedo et al., 2004	Paraíba	112	cães de caça	4 (3,6%)	IDGA

Tabela 1 - Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em diversas cidades e estados brasileiros de acordo com métodos sorológicos e bacteriológicos de diagnóstico, São Paulo – 2006

AUTORES	LOCAL	NÚMERO ANIMAIS	PROCEDÊNCIA DOS CÃES	Conclusão	
				POSITIVOS	DIAGNÓSTICO UTILIZADO
Keid et al., 2004a	São Paulo - SP	171	canis	58 (33,91%)	IDGA
				24 (14,03%)	hemocultura
Keid et al., 2004b	São Paulo - SP	139	canis	57 (41%)	hemocultura
Marassi; Moraes; Lilenbaum, 2004	Rio de Janeiro - RJ	501	domiciliados	36 (7,2%)	IDGA (antígeno de <i>B. ovis</i>)
				86 (17,2%)	IDGA (antígeno de <i>B. canis</i>)
Aguiar et al., 2005	Monte Negro - RO	304	região rural e urbana	11 (3,6%)	IDGA
				0 (0%)	IDGA-2ME

SAR: soroaglutinação rápida

SAR-2ME: soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol

SAL: soroaglutinação lenta

IDGA: imunodifusão em gel de ágar

FC: fixação de complemento

2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A brucelose canina é uma infecção sistêmica, de caráter crônico, caracterizada pela ocorrência de bacteremia prolongada. A infecção pode ocorrer através das membranas mucosas (oral, ocular, nasal e genital). Após a penetração no organismo do hospedeiro, a *Brucella canis* é fagocitada por macrófagos e outras células fagocitárias, sendo capaz de sobreviver e multiplicar-se no interior destas células. Posteriormente, as brucelas são transportadas aos linfonodos regionais provocando linfadenopatia periférica. O organismo atinge então, a circulação sanguínea sendo a bacteremia associada a leucócitos observada entre uma e quatro semanas pós-infecção, podendo persistir durante seis a 64 meses (FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976). Nesta fase, a concentração de microrganismos circulantes é bastante elevada, da ordem de 10^3 bactérias por mililitro de sangue (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; JOHNSON; WALKER, 1992; SPINK, 1970). Alguns cães podem apresentar bacteremia intermitente (GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979).

Durante a fase de bacteremia ocorre disseminação bacteriana por todo o organismo do hospedeiro, mas 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. Outros sítios de localização são os rins, circulação dos discos intervertebrais, meninges e câmara anterior dos olhos (CARMICHAEL; GREENE, 1990). Uma vez cessada a bacteremia, estes tecidos podem constituir sítios de persistência bacteriana, caracterizando a fase crônica da infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; JOHNSON; WALKER, 1992;

MOORE; KAKUK, 1969; SAEGUSA et al., 1978; SCHOEB; MORTON, 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; SPINK, 1970; UEDA et al., 1974a,b; ZAMORA; ALONSO; MARTIN, 1980).

A resposta imune é predominantemente celular, assim como em outros microrganismos intracelulares. Uma elevação nos níveis de anticorpos séricos pode ocorrer, porém estes não são protetores e apresentam pouca influência na redução da bacteremia e no número de organismos teciduais (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

Apesar da infecção sistêmica, os animais raramente apresentam-se clinicamente comprometidos. A febre não ocorre comumente, mesmo durante o período de bacteremia, devido à ausência de endotoxinas (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; JOHNSON; WALKER, 1992; SPINK, 1970; WANKE et al., 2004). Pelagem seca e sem brilho, perda do vigor, letargia, anorexia (RIECKE; RHOADES, 1975), perda de peso, depressão (CARMICHAEL; KENNEY, 1968) e intolerância ao exercício (CARMICHAEL; KENNEY, 1968) foram descritos, porém estes sintomas não se manifestam na maioria dos casos, (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE et al., 2004).

Nas cadelas infectadas, o abortamento seguido por secreção vaginal, assim como morte e reabsorção embrionária ou falha de concepção são os principais sinais clínicos observados. O abortamento pode ocorrer entre 30 e 57 dias de gestação, porém é mais comum entre os dias 45 e 55 (CARMICHAEL; KENNEY, 1968). A secreção vaginal pode durar de uma a seis semanas nas cadelas que abortaram e pode apresentar-se mucóide, sero-sanguinolenta ou purulenta (CARMICHAEL; KENNEY, 1968). Morte embrionária pode ocorrer entre 10 e 20 dias após o acasalamento (CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CICUTA; MIRANDA, 1990; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969; SPINK, 1970).

Nas fêmeas não gestantes, em geral não são observados outros sinais clínicos além da linfadenopatia (CARMICHAEL; KENNEY, 1970), mas existem relatos de vaginite (CARMICHAEL; KENNEY, 1970) e endometrite (CARMICHAEL; KENNEY, 1970).

Os fetos abortados apresentam-se parcialmente autolisados e com lesões características de infecção bacteriana generalizada: edema subcutâneo, congestão e hemorragia em região subcutânea abdominal, fluido peritoneal sero-sanguinolento com infiltrado de células inflamatórias, lesões degenerativas no fígado, baço, rins e intestinos (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; WANKE et al., 2004).

A ocorrência de natimortos e o nascimento de filhotes fracos, que morrem dentro de poucas horas, ou em poucos dias também foi relatada (CARMICHAEL; KENNEY, 1968). Quando a gestação progride a termo, filhotes mortos e vivos podem aparecer numa mesma ninhada (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE et al., 2004).

As fêmeas infectadas podem apresentar ninhadas subseqüentes normais, após um período de abortamento. Estima-se que 85% das fêmeas que abortaram podem ter partos subseqüentes normais, apesar de continuarem infectadas, disseminando a doença (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; SPINK, 1970). Falhas reprodutivas intermitentes podem ser observadas após gestações normais (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990).

Os filhotes sobreviventes podem nascer sadios e manifestar a doença apenas ao atingirem a idade adulta (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; LEWIS et al., 1973). A principal manifestação clínica da infecção nos cães antes de atingida a puberdade é a linfadenopatia generalizada (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CURRIER et al., 1982; JOHNSON;

WALKER, 1992). Há raros relatos de hiperglobulinemia, febre intermitente e leucocitose (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

Nos machos são encontradas lesões características de epididimite (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; GORDON; PUE; RUTGERS, 1985; LARSSON et al., 1984; UEDA et al., 1974), orquite (FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; SCHOEB; MORTON, 1978; GORDON; PUE; RUTGERS, 1985; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; MEGID et al., 2000), prostatite (GORDON; PUE; RUTGERS, 1985; LARSSON et al., 1984), dermatite da bolsa escrotal (GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979) e atrofia testicular (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979), podendo inclusive levar a esterilidade. (ANDERSON; BINNINGTON, 1983; CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CURRIER et al., 1982; GOMES et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 2004; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969; MOORE; KAKUK, 1969).

Na fase aguda da infecção em geral observa-se aumento do volume dos epidídimos e na fase crônica há redução do volume e aumento da consistência caracterizando atrofia testicular (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; MOORE; KAKUK, 1969; WANKE et al., 2004).

Alterações seminais tornam-se evidentes entre quatro e oito semanas após a infecção, sendo observados: espermatozóides imaturos, edema de peça intermediária, deformidades nos acrossomos, caudas dobradas, retenção de gota distal, cabeças soltas, redução da concentração e motilidade espermáticas e azospermia, além da presença de células inflamatórias, redução do volume ejaculado e dificuldade de ejaculação (GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979). Relata-se a presença de 90% dos espermatozóides anormais após 20 semanas de infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE,

1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; GONZÁLEZ et al., 2004; LARSSON et al., 1984).

A lesão testicular pode provocar uma resposta auto-imune que produz anticorpos anti-espermatozóides e aglutinação de espermatozóides em região de cabeça geralmente, após 15 a 18 semanas de infecção, resultando em esterilidade (CARMICHAEL; GREENE, 1990; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; GEORGE; CARMICHAEL, 1984; LARSSON et al., 1984; SERIKAWA et al., 1981b; SERIKAWA et al., 1984).

Além das manifestações em órgãos reprodutivos, sinais e lesões em outros tecidos também são comumente observados, como: linfadenopatia (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CURRIER et al., 1982; DAWKINS et al., 1982; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; LARSSON et al., 1984; UEDA et al., 1974a,b), esplenomegalia (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CURRIER et al., 1982; LARSSON et al., 1984), discoespondilite (ANDERSON; BINNINGTON, 1983; CARMICHAEL; GREENE, 1990; GONZÁLEZ et al., 2004; HENDERSON et al., 1974; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; HUROV et al., 1978; KERWIN et al., 1992; KORNEGAY; BARBER; 1980) osteomielite (CARMICHAEL; GREENE, 1990; SMEAK; OLMSTEAD; HOHN, 1987; THOMAS, 2000), uveíte, hifema e edema de córnea (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990; DZIEZYC, 2000; GONZÁLEZ et al., 2004; GWIN; KOLWALSKI; WYMAN, 1980; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; RIECKE; RHOADES, 1975; SAEGUSA et. al., 1977). Mais raramente pode-se observar dermatite piogranulomatosa (CARMICHAEL; GREENE, 1990; DAWKINS et al., 1982); meningoencefalomielite (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970) e glomerulonefrite (CARMICHAEL, 1990).

É importante destacar ainda a ocorrência de animais infectados assintomáticos, comportando-se como importantes fontes de infecção (FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; JOHNSON; WALKER, 1992; UEDA et al., 1974a,b; WANKE et al., 2004).

Relata-se recuperação espontânea da infecção entre um e cinco anos pós-infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990). Animais que se recuperaram da infecção apresentam títulos aglutinantes baixos ou ausentes e podem apresentar-se imunes à re-infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1990; MOORE; GUPTA, 1970).

2.5 TRANSMISSÃO

A transmissão do agente ocorre preferencialmente por contato direto, através da ingestão ou inalação de microrganismos presentes em materiais provenientes de cães infectados.

O contato com fetos e placenta de fêmeas que abortaram constitui a forma de transmissão mais comum, assim como secreções vaginais provenientes de cadelas que abortaram (quatro a seis semanas pós-abortamento) e de cadelas em estro (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; CICUTA; MIRANDA, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969). A eliminação vaginal do agente pode ocorrer em períodos variáveis nas fêmeas não gestantes e que não apresentam-se em estro (JOHNSON E WALKER, 1992).

A transmissão venérea também pode ocorrer (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970), assim como a congênita, a qual constitui a principal via de transmissão para os filhotes (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; KRAKOWKA, 1977; MOORE, 1969; MOORE; GUPTA, 1970).

O sêmen pode constituir uma importante via de eliminação devido ao elevado número de bactérias presentes, especialmente entre três e 11 semanas após a infecção. Após este período a eliminação seminal do agente pode ocorrer de maneira intermitente (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE; KAKUK, 1967).

A urina é um material potencialmente infectante, porém o contato prolongado com animais infectados é necessário para que ocorra a transmissão (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; SERIKAWA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979). A eliminação urinária inicia-se entre quatro e oito semanas após a infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979, SERIKAWA et al., 1981a) e de maneira geral considera-se que a concentração de bactérias na urina dos animais machos é superior à concentração nas fêmeas devido à presença do agente na próstata e epidídimos (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; SERIKAWA et al, 1978, SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979).

Animais cronicamente infectados podem albergar o agente na próstata e epidídimos durante meses, depois cessada a bacteremia e eventualmente eliminá-lo via sêmen ou urina (CARMICHAEL; SHIN, 1996; MOORE; KAKUK, 1969).

A concentração do agente no leite é alta, porém, sua importância do ponto de vista de transmissão é discutível, pois os filhotes provavelmente infectam-se no útero (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; MOORE, 1969). Pequenas quantidades de brucela foram isoladas da saliva, secreções nasais e oculares e fezes de cães infectados apresentando, estes materiais, menor importância na transmissão da brucelose

(JOHNSON; WALKER, 1992; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; WANKE et al., 2004).

2.6 DIAGNÓSTICO

Relatos de abortamento no terço final da gestação, falhas na concepção, epididimite, atrofia testicular, dermatite escrotal, discoespondilite e uveíte levam a suspeita clínica da brucelose. Somente com o exame clínico, porém não é possível o estabelecimento do diagnóstico da infecção por *Brucella canis*, sendo necessário o emprego de métodos laboratoriais indiretos e diretos para a confirmação da suspeita clínica (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969; WANKE et al., 2004).

Apesar da infecção generalizada, o hemograma, perfil bioquímico e urinálise em geral encontram-se inalterados (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MEGID et al., 2000; MOORE, 1969).

2.6.1 Diagnóstico Sorológico

O sorodiagnóstico da brucelose canina pode ser realizado empregando-se as seguintes provas: soroaglutinação rápida (SAR) (BADAKHSH; CARMICHAEL; DOUGLASS, 1982; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; GEORGE; CARMICHAEL 1974), soroaglutinação lenta (SAL) (ALTON et al., 1976), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (MYERS; JONES; VARELA-DIAZ, 1972; MYERS; VARELA-DIAZ; COLTORTI, 1974) e ELISA (ARESE et al., 1999; CLOECKAERT et al., 2001; WANKE; DELPINO; BALDI, 2002; ZYGMUNT et al., 2002).

A estirpes bacterianas geralmente utilizadas para produção de antígenos são: *Brucella ovis* Reo 198, *B. canis* RM6/66 e uma estirpe menos mucóide de *B. canis* (*B. canis* M-) (ZOHA; CARMICHAEL, 1981). Ressalta-se que o compartilhamento de antígenos entre *Brucella canis* e *Brucella ovis* (espécies rugosas de *Brucella*) possibilita o emprego indistinto de reativos produzidos a partir destes dois microrganismos para o diagnóstico da brucelose em ovinos e caninos (CARMICHAEL, 1976; GEORGE; CARMICHAEL, 1974, 1978; MARASSI; MORAES; LILENBAUM, 2004).

As provas sorológicas podem utilizar tanto antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa quanto proteínas solúveis presentes no citoplasma bacteriano.

Os testes baseados em antígenos de superfície bacteriana apresentam alta sensibilidade no diagnóstico da brucelose em cães (ALTON et al., 1976; CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; KENNEY, 1968), sendo recomendados como provas de triagem no diagnóstico. Anticorpos produzidos contra antígenos superficiais podem ser detectados no soro de cães infectados entre quatro e 12 semanas pós-infecção, dependendo do teste empregado (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Todavia, os antígenos de superfície bacteriana utilizados no diagnóstico da brucelose também são compartilhados com outros gêneros de bactérias, como *Moraxella* sp (CARMICHAEL, 1976), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* e *Bordetella bronchiseptica* (JOHNSON E WALKER, 1992; PICKERILL, 1970), resultando na ocorrência de reações cruzadas entre estes e anticorpos não específicos presentes no soro de animais não infectados (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; JOUBERT; JONES, 1989; CARMICHAEL; GREENE, 1990;

CARMICHAEL; SHIN, 1996; IRIBARREN et al., 1999). Dessa maneira, resultados positivos devem ser confirmados por métodos de diagnóstico mais específicos.

Em geral, os títulos de anticorpos anti-LPS permanecem elevados enquanto há persistência de bacteremia. A tendência é que ocorra redução dos títulos de anticorpos séricos com o passar do tempo, de maneira que os animais permanecem com títulos baixos ou sorologicamente negativos (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO., 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; FLORES-CASTRO; SAEGUSA et al., 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; GEORGE;DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; LARSSON; COSTA, 1980; LARSSON et al., 1984; MOORE; KAKUK, 1969; NICOLETTI; CHASE, 1987; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; ZAMORA et al., 1980; ZOHA; CARMICHAEL, 1982), porém, pode ocorrer flutuação nos títulos de anticorpos tanto na presença quanto na ausência de bacteremia (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON et al., 1982; MEGID et al., 2000). Animais cronicamente infectados, com ausência de bacteremia e negativos ou com baixos títulos nas provas sorológicas podem albergar o microrganismo em diversos tecidos corporais (CARMICHAEL; GREENE, 1990; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; ZOHA; CARMICHAEL, 1982). Nas fêmeas cronicamente infectadas, é comum a recrudescência da bacteremia e o aumento nos títulos de anticorpos durante os períodos de estro, gestação ou abortamento, os quais são adequados para realização do diagnóstico (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

Variações em termos de especificidade dos testes sorológicos podem ser observadas de acordo com a estirpe bacteriana empregada para produção do antígeno (CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; MARASSI; MORAES; LILENBAUM, 2004; MATEU-DE-ANTONIO; MARTIN; SOLER, 1993). O emprego da estirpe de *Brucella canis* M- como antígeno em geral resulta na redução da proporção de falsos-positivos, quando comparada à *B. canis*

RM6/66 e *B. ovis* (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; SHIN, 1996).

As provas de SAR, SAL e IDGA são rotineiramente realizadas empregando-se antígenos de superfície bacteriana. As provas de SAR e SAL são semelhantes em termos de sensibilidade e especificidade, permitindo detecção de anticorpos entre 4 e 8 semanas após a infecção. A SAR apresenta como vantagem o fato de constituir uma prova rápida, de fácil realização e bastante sensível (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; GEORGE; CARMICHAEL, 1974) e em geral é realizada empregando-se *B. ovis* como antígeno.

A SAL é uma prova quantitativa, permitindo o monitoramento de títulos de anticorpos, o que é importante no caso de cães em tratamento (CARMICHAEL, 1990), em canis na fase de saneamento da infecção ou em programas de controle. Títulos de 50 a 100 indicam suspeita de infecção, sendo considerados positivos no teste animais com títulos iguais ou maiores que 200 (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992). A SAL foi bastante utilizada como prova confirmatória de resultados positivos na SAR, mas está sujeita aos mesmos problemas de especificidade desta.

O emprego de agentes redutores de pontes de enxofre como o 2-mercaptoetanol (2-ME) nas provas de aglutinação reduz a ocorrência de reações falso-positivas, pois desnatura as moléculas IgM, menos específicas que as IgG aumentando assim a especificidade da reação (BADAKHSH; CARMICHAEL; DOUGLASS, 1982; CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; SAEGUSA et al., 1977). A detecção de anticorpos ocorre, portanto num período mais tardio, ao redor de 12 semanas pós-infecção, podendo gerar resultados falso-negativos na fase inicial da infecção (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; MEGID et al., 2000; SAEGUSA et al.,

1978). Elevadas porcentagens de reações inespecíficas, mesmo após o emprego do 2-mercaptoetanol, podem ser observadas, sendo necessária a confirmação dos resultados positivos (BADAKHSH; CARMICHAEL; DOUGLASS, 1982; CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992). As provas de SAR e SAL com 2-mercaptoetanol são, portanto consideradas provas de alta sensibilidade e indicadas como provas de triagem, relatando-se 99% de correlação entre um resultado negativo e a ausência de infecção (CARMICHAEL, 1976, 1979, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; NICOLETTI; CHASE, 1987).

A IDGA empregando antígenos de superfície bacteriana é considerada uma prova mais específica do que os testes de aglutinação, porém, reações inespecíficas ainda podem ser observadas, sendo indicada como prova de triagem. Em termos de sensibilidade, assemelha-se aos testes de SAR e SAL (CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; JOHNSON E WALKER, 1992) e permite a detecção de anticorpos entre oito e 12 semanas pós-infecção (CARMICHAEL, 1990; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Proteínas citoplasmáticas solúveis de *Brucella* podem ser utilizadas como antígenos nos testes sorológicos. A prova de imunodifusão, empregando proteínas citoplasmáticas revelou menor frequência de reações cruzadas com outros gêneros de bactérias, apresentando maior especificidade no diagnóstico da brucelose, sendo útil como prova confirmatória (JOHNSON; WALKER, 1992; MATEU-DE-ANTONIO; MARTIN; SOLER, 1993; ZOHA; CARMICHAEL, 1982). Os anticorpos anti-LPS atingem níveis séricos detectáveis num período mais recente da infecção (WANKE et al., 2004), porém estes níveis tendem a declinar uma vez que a bacteremia cessa. Os anticorpos contra proteínas citoplasmáticas persistem por períodos mais prolongados (seis a 36 meses após cessada a bacteremia), possibilitando o

diagnóstico de infecções crônicas (CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; ZOHA; CARMICHAEL, 1982). Por outro lado, a sensibilidade da IDGA empregando antígenos citoplasmáticos pode ser baixa na fase inicial da infecção (primeiras 14 a 16 semanas) (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FERREIRA et al., 2003; JOHNSON; WALKER, 1992; NICOLETTI; CHASE, 1987).

Uma desvantagem das provas baseadas em antígenos internos é a detecção de anticorpos produzidos contra brucelas lisas e rugosas, não possibilitando a identificação da espécie de *Brucella* responsável pela infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT; JONES, 1989; CARMICHAEL; SHIN, 1996; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Diversos testes de ELISA vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose canina, utilizando tanto antígenos de superfície bacteriana, constituídos por R-LPS e proteínas de membrana (MATEU-DE-ANTONIO; MARTIN; SOLER, 1993; MÓLNAR et al., 2001; WANKE; DELPINO; BALDI, 2002), como antígenos compostos por proteínas citoplasmáticas (BALDI et al., 1994, 1997; WANKE; DELPINO; BALDI, 2002).

Ensaio imunoenzimático utilizando proteínas recombinantes de *Brucella* spp. como antígenos foram propostos para o diagnóstico da brucelose, tendo como vantagem uma maior eficiência na purificação do antígeno e maior especificidade na detecção da infecção (ARESE et al., 1999; CLOECKAERT et al., 2001; WANKE; DELPINO; BALDI, 2002; ZYGMUNT et al., 2002). Em alguns casos, porém, uma baixa sensibilidade na detecção de anticorpos específicos foi observada. As proteínas recombinantes Omp31 (CASSATARO et al., 2004) e LS (Lumazine Synthase) (WANKE; DELPINO; BALDI, 2002) de *Brucella* spp. foram utilizadas para o sorodiagnóstico da brucelose canina, apresentando sensibilidade de 87% e 92% respectivamente em cães positivos bacteriologicamente. O ELISA com a proteína

BP26 foi também utilizado no diagnóstico da brucelose canina, apresentando sensibilidade de 98% e especificidade de 97% (ARESE et al., 1999).

2.6.2 Diagnóstico Bacteriológico

O cultivo microbiológico do agente é considerado o método definitivo para o diagnóstico da infecção por *Brucella canis* (CARMICHAEL, 1976; MOORE, 1969; SAEGUSA et al., 1977) e tem sido indicado para a confirmação de resultados positivos obtidos nos testes sorológicos de triagem (FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; GODOY; PERES; BARG, 1977; LARSSON; COSTA, 1980; UEDA et al., 1974a,b). O agente pode ser encontrado em amostras de sangue, urina, secreções vaginais, sêmen, leite e tecidos (linfonodos, baço, fígado, medula óssea e órgãos reprodutivos) (CURRIER et al., 1982; MOORE; GUPTA, 1970; UEDA et al., 1974a,b).

A hemocultura é o método de escolha para o isolamento do microrganismo, por permitir um diagnóstico recente (uma a duas semanas após a infecção) e devido ao prolongado período de bacteremia, característico da infecção (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; IRIBARREN et al., 1999; LARSSON; COSTA, 1980; MOORE, 1969; MOORE; GUPTA, 1970; PILLAI; NEDUNCHELLIYAN; RAGHAVAN, 1991; UEDA et al., 1974a,b). Em geral, o isolamento bacteriano a partir de amostras de sangue ocorre em animais com altos títulos de anticorpos séricos (FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; IRIBARREN et al., 1999; SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; UEDA et al., 1974a,b).

As limitações apontadas para a confirmação do diagnóstico da infecção por *B. canis*, através da hemocultura são: período mínimo de dez dias para obtenção de resultados e a baixa sensibilidade do procedimento quando de infecções crônicas (ZOHA; CARMICHAEL, 1982), quando o agente permanece em sítios teciduais, como testículos, epidídimos, próstata, linfonodos, baço, fígado e medula óssea (FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; SAEGUSA et al., 1978; UEDA et al., 1974a,b). O declínio da bacteremia ocorre entre 58 a 64 meses de infecção e períodos intermitentes de bacteremia (principalmente após 30 semanas de infecção), podem ser observados, dificultando o isolamento bacteriano (JOHNSON; WALKER, 1992).

O isolamento bacteriano a partir de amostras de sêmen (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979) e urina (MOORE; KAKUK, 1969) nos animais machos é indicado respectivamente entre 3-12 e 8-30 semanas pós-infecção, quando um elevado número de microrganismos é eliminado por estes fluidos (JOHNSON; WALKER, 1992). Sêmen e urina também podem ser utilizados no diagnóstico da infecção em cães cronicamente infectados ou que apresentam orquite, epididimite e prostatite (CARMICHAEL; GREENE, 1990; MOORE; KAKUK, 1969; SERIKAWA et al, 1978).

No caso das fêmeas infectadas, secreções vaginais e tecidos fetais são materiais empregados com sucesso para o isolamento bacteriano no período após o abortamento, por conterem um grande número de microrganismos, os quais são eliminados durante várias semanas (CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CICUTA; MIRANDA, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969). Em outros períodos do ciclo estral, o isolamento a partir de secreções vaginais não apresenta valor como método de diagnóstico (JOHNSON; WALKER, 1992). Nas fêmeas, a eliminação de *Brucella* pela via urinária ocorre em geral durante a fase de bacteremia, quando o agente também pode ser isolado em amostras de sangue (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979).

O isolamento a partir de amostras de tecidos pode ser facilmente realizado nos animais em bacteremia. Nos animais cronicamente infectados, quando a bacteremia cessa, o isolamento bacteriano pode ser realizado a partir de testículos, próstata, epidídimos, baço, linfonodos, e medula óssea (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; GOMES et al., 1999; GORDON; PUE; RUTGERS, 1985; MEGID et al., 2000; MOORE, 1969; MOORE; KAKUK, 1969; SAEGUSA et al., 1978; SCHOEB; MORTON, 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; UEDA et al., 1974a,b; VARGAS et al., 1996).

Apesar do cultivo bacteriológico permitir a detecção específica do agente etiológico da brucelose, os métodos de isolamento e identificação bacteriana demandam tempo, impõem riscos decorrentes da manipulação bacteriana (ALTON et al., 1976; GODOY et al., 1979) e estão ainda sujeitos a resultados falso-negativos em consequência da contaminação das amostras, interferência de antibioticoterapia e da baixa sensibilidade do método, de acordo com o estágio da infecção (CARMICHAEL, 1976).

2.6.3 Diagnóstico pela Reação em Cadeia pela Polimerase

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem sendo empregada como instrumento para o aprimoramento do diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e no homem, por apresentar-se mais sensível que os métodos bacteriológicos. 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 (BRICKER, 2002; DAHOUK et al., 2003).

A PCR foi empregada com sucesso para a detecção de *Brucella* em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras, como sangue (AL-NAKKAS et al., 2002; AL-NAKKAS; MUSTAFA; WRIGHT, 2005; ELFAKI et al., 2005a;

GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995, 2000; MATAR; KHNEISSER; ABDELNOOR, 1996; MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; MORATA et al., 1999; NAVARRO; CASAL; SOLERA, 2004; NAVARRO et al., 1999, 2002; NIMRI, 2003; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; VIEIRA, 2004; ZERVA et al., 2001), soro (ELFAKI et al., 2005b; ZERVA et al., 2001), leite (HAMDY; AMIN, 2002; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995, 2000; RIJPEHS et al., 1996; ROMERO et al., 1995; ROMERO; LOPEZ-GONI, 1999; SREEVATSAN et al., 2000; TANTILLO et al., 2001;), sêmen (AMIN; HAMDY; IBRAHIM, 2001; KEID, 2001; MANTEROLA et al., 2003), *swab* vaginal (KEID, 2001), queijo (SERPE et al., 1999; TANTILLO et al., 2001; TANTILLO; DI PINTO; BUONAVOGLIA, 2003), órgãos (ÇETINKAYA et al., 1999; COLMENERO et al., 2002; CORTEZ et al., 2001; FEKETE; BANTLE; HALLING, 1992; GALLIEN et al., 1998; LEYLA; KADRI; UMRAN, 2003; MORATA et al., 2001; RICHTZENHAIN et al., 2002) e ainda urina, fluido sinovial, fluido cerebrospinal e material purulento (COLMENERO et al., 2002; MORATA et al., 2001).

A detecção de DNA de *Brucella* spp. em sangue total pela PCR foi relatada em bovinos, caprinos, búfalos, humanos e caninos (AL-NAKKAS et al., 2002, AL-NAKKAS; MUSTAFA; WRIGHT, 2005; ELFAKI et al., 2005a; GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995, 2000; MATAR; KHNEISSER; ABDELNOOR, 1996; MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; MORATA et al., 1999; NAVARRO et al., 1999, 2002; NIMRI et al., 2003; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997, 1999; VIEIRA, 2004; ZERVA et al., 2001).

O diagnóstico da brucelose em amostras de sêmen ovino, bovino e canino já foi descrita, apresentando alta sensibilidade relativa ao cultivo microbiológico (AMIN; HAMDY; IBRAHIM, et al., 2001; KEID, 2001; MANTEROLA et al., 2003). A técnica também foi

empregada para detecção de DNA de *Brucella* em *swab* vaginal, provenientes de cadelas naturalmente infectadas (KEID, 2001).

Diversos *primers* específicos para detecção de DNA do gênero *Brucella* foram descritos na literatura, sendo que os *primers* B4 e B5, direcionados ao gene codificador da proteína de 31KDa de *Brucella* foram mais amplamente utilizados para o diagnóstico da brucelose em diversos tipos de amostras e hospedeiros (COLMENERO et al., 2002; CORTEZ et al., 2001; ELFAKI et al., 2005a,b; GALLIEN et al., 1998; KEID, 2001; MATAR; KHNEISSER; ABDELNOOR, 1996; MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998, MORATA et al., 1999, 2001; NAVARRO et al., 1999, 2002; QUEIPO-ORTUNO et al., 1997; RICHTZENHAIN et al., 2002; TANTILLO et al., 2001; ZERVA et al., 2001).

Apesar de sua ampla utilização e elevada sensibilidade diagnóstica, os *primers* B4 e B5 mostraram-se capazes de DNA proveniente da bactéria *Ochrobactrum* spp., o que pode gerar resultados falso-positivos (CASANAS et al., 2001). O *Ochrobactrum* apresenta elevada similaridade de sequências gênicas com as bactérias do gênero *Brucella* (VELASCO et al., 1998), porém, infecções por *Ochrobactrum* não são consideradas clinicamente relevantes em humanos (CASANAS et al., 2001), apesar da prevalência da infecção em cães ser desconhecida.

A PCR foi utilizada no diagnóstico da brucelose canina em amostras de trato reprodutivo de cães (*swab* vaginal e sêmen), empregando os *primers* B4 e B5 e um protocolo de extração de ácidos nucleicos baseado na utilização do isotiocianato de guanidina. Valores de sensibilidade e especificidade respectivamente de 64,2% e 91,4% foram verificados em relação a hemocultura (KEID, 2001). A metodologia, porém não foi aplicada com sucesso em amostras de sangue. Após inúmeras alterações no grau de estringência da PCR, não foi possível a detecção de DNA de *Brucella* spp. em sangue periférico de cães. Fragmentos múltiplos eram gerados pela PCR, tornando impossível a visualização de um sinal específico.

Com o objetivo de encontrar um novo alvo para a identificação de *Brucella* pela PCR, Vieira (2004) desenhou os *primers* ITS66 e ITS279, direcionados à região interespçadora do DNA codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp. e avaliou seu desempenho no diagnóstico da brucelose canina. Os *primers* são potencialmente específicos para *Brucella*. Além disso, a região ITS apresenta-se em 3 cópias no genoma, o que possibilitou ampliar a sensibilidade da reação. Os *primers* apresentaram elevada sensibilidade analítica, de maneira que a PCR permitiu a detecção de um maior número de cães positivos quando comparada ao isolamento bacteriano em amostras de sangue (VIEIRA, 2004).

2.7 Tratamento

A *B. canis* é suscetível a diversos antibióticos *in vitro* (MATEU-DE-ANTONIO; MARTÍN, 1995; TERAKADO et al., 1978); porém, assim como em outras infecções causadas por microrganismos intracelulares facultativos, a quimioterapia é freqüentemente mal sucedida (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JENNINGS et al., 1974; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969). Em função da possibilidade de falhas e do alto custo do tratamento, em geral recomenda-se o sacrifício dos cães infectados, principalmente quando se tratam de animais de canis.

Em geral há declínio da bacteremia e dos títulos de anticorpos séricos com o início da antibioticoterapia (JOHNSON; WALKER, 1992), o que não necessariamente indica erradicação da infecção. Semanas ou meses depois de descontinuado o tratamento, os animais voltam a apresentar elevação dos títulos de anticorpos e/ou o agente passa novamente a ser recuperado de amostras de sangue e outros tecidos (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969). Muitas vezes, não há retorno da bacteremia, mas o microrganismo persiste em determinados órgãos (JOHNSON; WALKER, 1992).

A realização de antibioticoterapia durante a gestação em cadelas infectadas reduz as chances de abortamento, porém, as fêmeas podem permanecer em bacteremia e soropositivas uma vez que o tratamento é suspenso, o que pode resultar no nascimento de filhotes infectados (JOHNSON et al., 1982; CARMICHAEL; GREENE, 1990; MOORE, 1969).

Diversos regimes de tratamento utilizando tetraciclina, sulfonamidas, eritromicina, ampicilina e outros agentes já foram empregados (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON et al., 1982; JOHNSON; WALKER, 1992; LEWIS et al., 1973; NICOLETTI, 1991), porém o esquema de tratamento mais efetivo parece consistir da associação de minociclina via oral na dose de 25mg/kg/dia durante duas semanas e diidroestreptomicina intramuscular na dose de 5mg/kg/dia a cada 12 horas durante uma semana (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992). O tratamento deve ser repetido após um curto intervalo de tempo (JENNINGS et al., 1974).

Para garantir o sucesso do tratamento, testes sorológicos e bacteriológicos devem ser realizados nos animais durante pelo menos seis meses após o término da antibioticoterapia (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JENNINGS et al., 1974). Em cães machos com lesões testiculares decorrentes de brucelose, o tratamento pode eliminar o agente, mas não há recuperação da fertilidade do animal (CARMICHAEL; GREENE, 1990; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; MOORE; KAKUK, 1969). Além disso, dificilmente consegue-se eliminar o agente de tecidos prostáticos (CARMICHAEL; GREENE, 1990; MOORE, 1969).

2.8 Controle e Prevenção da Infecção

O controle e a profilaxia da brucelose canina, em populações de cães confinadas envolve procedimentos como a confirmação do diagnóstico através de testes sorológicos e

bacteriológicos, eliminação de cães infectados, quarentena, além da implantação de práticas para a prevenção de futuros surtos (JONES; EMERSON, 1984; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972). Na ocorrência de abortamento, falhas de concepção, epididimite e infertilidade nas criações de cães, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado em todos os animais do plantel.

O controle da brucelose em canis infectados baseia-se nas seguintes medidas: identificação e remoção de todos os animais positivos do local, identificação das vias de transmissão, quarentena durante o período de erradicação da infecção, higienização das instalações, repetição mensal dos exames laboratoriais em todos os cães para identificação de todos os cães positivos e estabelecimento de medidas para prevenir novos surtos (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969).

Uma vez que a infecção é confirmada num plantel, todos os animais devem ser testados sorologicamente e bacteriologicamente, em intervalos mensais, para identificação dos positivos (CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992).

Os animais infectados devem ser removidos do canil, pois a separação de cães sadios e infectados no mesmo canil parece não ser suficiente para evitar a propagação da infecção, mesmo empregando-se rígidas medidas de higiene (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; MOORE, 1969; PICKERILL, 1970; SPINK, 1970). Machos e fêmeas, diagnosticados como positivos devem ser afastados dos programas de reprodução (CARMICHAEL; GREENE, 1990) e a higienização das instalações deve ser rigorosamente realizada (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

Os testes laboratoriais devem ser realizados mensalmente até que todos os animais positivos sejam identificados. Uma vez que todos os animais apresentem resultados negativos durante três exames consecutivos, os exames podem ser realizados a cada 3-4 meses, durante

o período de um ano, com o objetivo de evitar a ocorrência de novos surtos (JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE et al., 2004).

A prevenção da infecção é particularmente importante nos canis comerciais, já que uma vez que a infecção é introduzida numa população canina confinada, sua disseminação ocorre rapidamente, acometendo um grande número de animais (SPINK, 1970). Exames sorológicos e bacteriológicos rotineiros devem ser realizados em todos os cães do plantel a cada seis meses, assim como nos animais previamente ao acasalamento (JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE et al., 2004). Novos animais introduzidos no plantel devem antes ser submetidos aos exames clínico e laboratorial e então devem ser mantidos em quarentena durante 8 a 12 semanas, quando os testes laboratoriais devem ser repetidos (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969; PICKERILL, 1970; WANKE et al., 2004). Cães expostos ao agente infeccioso ou que apresentam sinais clínicos sugestivos de brucelose não devem ser introduzidos no plantel (JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE et al., 2004).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta como objetivos:

1. Padronizar a técnica de PCR, utilizando-se os *primers* ITS66 e ITS279 (VIEIRA, 2004), direcionados à região interespaçadora do DNA codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp., aplicada à detecção de DNA de *Brucella* spp. em amostras sêmen e *swab* vaginal provenientes de cães naturalmente infectados.
2. Comparar o desempenho da PCR aplicada em amostras de sangue, sêmen e *swab* vaginal com o desempenho do cultivo microbiológico realizado a partir destas mesmas amostras e com o desempenho das provas sorológicas de soroaglutinação rápida em placa e soroaglutinação rápida em placa com 2-mercaptoetanol e imunodifusão em gel de ágar.
3. Estabelecer um protocolo de diagnóstico associando métodos diretos e indiretos de diagnóstico que permita a identificação de cães infectados por *Brucella canis* com rapidez e acurácia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS

As estirpes de referência de *Brucella canis* RM6/66 (ATCC 23365; BCCN R18) e *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331 (ATCC 49188), foram utilizadas respectivamente para determinação da sensibilidade e especificidade analíticas da reação em cadeia pela polimerase em amostras de *swab* vaginal e sêmen de cães.

A estirpe de *B. canis* RM6/66 foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marisa da Costa, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A estirpe de *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331 foi cedida Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 196 cães (145 fêmeas e 51 machos) provenientes de 14 canis comerciais do Estado de São Paulo sem distinção de raça ou idade. Os canis localizavam-se nos seguintes municípios do Estado de São Paulo: São Paulo, Cotia, São Roque, Vargem Grande Paulista. Dos 14 canis utilizados, 10 possuíam cães com problemas reprodutivos ou adquiriram cães de plantéis em que o agente tenha sido isolado. Em quatro canis não foram observados problemas reprodutivos característicos de brucelose.

4.3 ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães foram submetidos à anamnese e avaliação clínica para determinação da presença de pelo menos um dos sinais clínicos sugestivos de brucelose: secreção vaginal fora do período de estro ou pós-parto, abortamento, ocorrência de natimortos, nascimento de filhotes fracos, orquite, epididimite, falha de concepção, aumento do volume de linfonodos mandibulares e poplíteos, sensibilidade em região de coluna. Foram considerados os sinais clínicos observados no momento da colheita ou em período precedente.

4.4 AMOSTRAS CLÍNICAS

Todas as amostras clínicas foram colhidas durante as visitas aos canis.

4.4.1 Amostras de Sangue e Soro

Foram colhidas amostras de sangue dos 196 cães por punção das veias cefálica ou jugular, em tubos de colheita a vácuo e estéreis.

Três mililitros de sangue foram colhidos em tubos a vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante e separados em duas alíquotas. Uma alíquota de sangue (2mL) foi utilizada no cultivo microbiológico, uma segunda alíquota (1mL) foi estocada a -20°C até ser testada pela PCR.

Quatro mililitros de sangue foram colhidos em tubos à vácuo sem anticoagulante, os quais foram centrifugados para obtenção de soro. As amostras de soro foram estocadas a -20°C .

4.4.2 Amostras de Trato Reprodutivo

Foram colhidas amostras de sêmen dos machos e de *swab* vaginal das fêmeas.

4.4.2.1 Amostras de Sêmen

As amostras de sêmen foram colhidas de 51 machos por excitação manual do pênis. Foram colhidas, quando possível, as três frações seminais (pré-espermática, espermática e prostática) em tubo estéril. Uma alíquota (100µL) foi utilizada para o isolamento bacteriano e outra, de volume variável (100µL a 1000µL) foi estocada a -20°C até ser testada pela PCR. Foram obtidas amostras de sêmen de volume variável, em decorrência da diversidade de raças, idade e temperamento dos cães examinados.

4.4.2.2 Amostras de *Swab* Vaginal

Foram colhidas duas amostras de *swab* vaginal de cada uma das 145 fêmeas examinadas, independente da idade, período do ciclo estral e da presença ou não de secreção vaginal. Utilizou-se *swab* estéril, sendo uma amostra acondicionada em frasco estéril contendo 3mL de Caldo Fosfato Triptose (Difco) acrescido da seguinte mistura de antibióticos: polimixina B (Sigma) (1800UI/L), ciclohexamida (Sigma) (30mg/L) e bacitracina (Sigma) (7500UI/L) (BROWN; RANGER; KELLEY, 1971). O Caldo Fosfato Triptose acrescido de antibióticos foi utilizado apenas como meio de transporte das amostras ao laboratório.

Uma segunda amostra de *swab* vaginal foi acondicionada em microtubo contendo 1mL do tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA) e estocada a -20°C até realização da PCR.

4.5 SORODIAGNÓSTICO

A prova de soroaglutinação com antígeno acidificado tamponado foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Universidade de São Paulo (USP). A prova de IDGA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Universidade de São Paulo (USP).

As provas de soroaglutinação rápida e soroaglutinação rápida com 2-mercaptoetanol foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada às Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista no Campus de Botucatu.

4.5.1 Prova de Soroaglutinação Rápida (SAR)

As amostras de soro colhidas foram submetidas à prova de soroaglutinação rápida em placa, empregando-se o *kit* D-tec CB (Synbiotics Corporation, San Diego, USA). O teste emprega como antígeno a *B. ovis* inativada e corada com Rosa Bengala.

A prova foi realizada acrescentando-se 30µL de soro a 30µL do antígeno. A mistura foi homogeneizada e a leitura realizada após 4 minutos. Foram considerados positivos os

soros que apresentaram aglutinação (presença de grumos) em presença do antígeno. Nos soros não reagentes não foi observada aglutinação (ausência de grumos).

4.5.2 Prova de Soroaglutinação Rápida com Emprego do 2-mercaptoetanol (SAR-ME)

Os soros foram tratados com uma solução 0,2M de 2-mercaptoetanol (2 gotas de soro foram acrescentadas a 2 gotas da solução de 2-mercaptoetanol) e em seguida submetidos à prova de soroaglutinação rápida. A leitura foi realizada após 15 minutos. De maneira semelhante à prova de soroaglutinação rápida (SAR), foram considerados positivos os soros que apresentaram aglutinação (presença de grumos) em presença do antígeno.

4.5.3 Prova de Soroaglutinação Rápida em Placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

Todas as amostras de soro colhidas foram submetidas à prova de soroaglutinação rápida em placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (ALTON et al., 1976). O antígeno utilizado consistiu de uma suspensão celular inativada da estirpe 1119-3 de *B. abortus*, na concentração de 8,0% e pH 3,65, corada pelo Rosa Bengala. O antígeno foi produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

As reações foram realizadas em placas de vidro quadriculadas padrão, depositando-se 0,03mL do soro a ser testado e 0,03mL do antígeno. A homogeneização foi realizada com emprego de bastão de vidro e a leitura realizada após 4 minutos.

Foram considerados positivos os soros que apresentaram aglutinação (presença de grumos) em presença do antígeno. Nos soros não reagentes não foi observada aglutinação (ausência de grumos).

4.5.4 Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

A prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi realizada em amostras de soro provenientes de 167 cães (128 fêmeas e 39 machos). As amostras de soro hemolisadas não foram empregadas no teste em decorrência da dificuldade na interpretação dos resultados.

O antígeno empregado foi produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar) e consiste de proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da amostra Reo 198 de *Brucella ovis*. A prova foi realizada de acordo com as recomendações do laboratório produtor.

O gel de ágar foi preparado utilizando-se 1,2g de ágar Noble, 5mL de tampão Borato pH 8,3; 93mL de NaCl a 10% e 1mL de Azida Sódica a 1%. Em seguida foram distribuídos 4,5mL do gel em lâminas de vidro sem ranhuras. Após a solidificação, o gel foi perfurado com moldes de 6mm de diâmetro e 2,5mm de distância entre as bordas, contendo um orifício central e outros seis periféricos. Os orifícios foram então preenchidos com antígeno, soros controles positivos e soros a testar e as lâminas mantidas em câmara úmida em temperatura ambiente.

A leitura foi realizada após 72 horas, utilizando-se sistema de iluminação indireta e fundo escuro. A interpretação foi efetuada observando-se a formação de linha de precipitação entre os soros testes e soros controle positivos com o antígeno. Os soros testes cujas linhas de precipitação apresentaram identidade com as linhas formadas pelos soros controles positivos,

foram considerados positivos. Os soros considerados negativos foram aqueles em que não houve formação de linhas de precipitação ou as linhas formadas não apresentaram identidade com as dos soros controles positivos.

4.6 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

O cultivo microbiológico de *Brucella canis* a partir de amostras de sangue e de trato reprodutivo (sêmen e *swab* vaginal) foi realizado no 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.

4.6.1 Isolamento Bacteriano de Amostras de Sangue

As amostras de sangue colhidas na presença de citrato de sódio (2mL) foram inoculadas em 12mL de Caldo Fosfato Triptose (Difco) e incubadas em aerobiose a 37°C durante 30 dias (ALTON, et al. 1976). A cada cinco dias foram realizados repiques em placas contendo Ágar Sangue Triptose (Difco), as quais foram incubadas a 37°C, em aerobiose durante sete dias. As colônias isoladas foram posteriormente submetidas a identificação bacteriana.

4.6.2 Isolamento Bacteriano de Amostras de Trato Reprodutivo (Sêmen e *Swab* Vaginal)

As amostras de sêmen colhidas em frasco estéril e de *swab* vaginal colhidas em Caldo Fosfato Triptose com antibióticos foram semeadas em placas contendo Ágar Sangue Triptose (Difco) acrescido da mesma mistura de antibióticos mencionada no item 4.3. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a identificação das colônias isoladas.

4.6.3 Identificação bacteriana

A identificação bacteriana foi baseada em características morfológicas e bioquímicas das colônias isoladas.

4.6.3.1 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., 1976). As colônias bacterianas com morfologia sugestiva do gênero *Brucella* (1 a 2 mm de diâmetro, coloração mel, translúcidas e claras, na forma de cocobastonetes pequenos e fracamente Gram negativos) foram submetidas às provas bioquímicas.

4.6.3.2 Características Bioquímicas

As provas bioquímicas empregadas para identificação presuntiva de *Brucella canis* foram as seguintes: oxidase, catalase, produção de H₂S, fermentação de açúcares, produção de gás, urease, indol, motilidade, utilização de citrato, redução de nitratos, características tintoriais na presença de cristal violeta, aglutinação na presença de acrtiflavina e crescimento em presença de fucsina básica e tionina (20µg/ml) (ALTON et al., 1976).

Foram identificadas como pertencentes ao gênero *Brucella* as colônias bacterianas isoladas na forma de coco-bastonetes Gram-negativos, apresentando as características bioquímicas descritas na tabela 2.

Tabela 2: Características bioquímicas das bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*. São Paulo – 2006

PROVA BIOQUÍMICA	CRESCIMENTO
Oxidase	Positivo
Catalase	Positivo
Hidrólise de gelatina	Negativo
Fermentação em meio Tríplice Açúcar e Ferro (TSI)	Negativo
Utilização de citrato	Negativo
Indol	Negativo
Motilidade	Negativo
Redução de nitrato	Positivo

Foram presuntivamente identificadas como *Brucella canis* as colônias de *Brucella* que apresentaram as seguintes características: independência de CO₂, produção de H₂S negativa, aglutinação na presença do corante acriflavina (1mg/ml), coloração pelo cristal violeta, urease positivas e crescimento em presença dos corantes tionina e fucsina básica (20µg/ml) (ALTON et al., 1976).

4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo (sêmen e *swab* vaginal) foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.7.1 Extração de Ácidos Nucléicos de Colônias Bacterianas e de Amostras Clínicas

A extração e purificação de ácidos nucleicos das colônias bacterianas e das amostras clínicas de foi realizada utilizando-se digestão enzimática e solventes orgânicos.

4.7.1.1 Extração de Ácidos Nucléicos de Bactérias Oriundas de Cultura Pura

A extração de DNA de bactérias *Brucella canis* RM6/66 e *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331, oriundas de cultura pura foi realizada de acordo com o protocolo descrito por AUSUBEL et al. (1999).

1. Suspende uma alça coletada da colônia pura em 400µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%; 10µL Proteinase K a 20mg/mL);
2. Agitar por 10 segundos em vórtex;
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 70µL de NaCl (5M);
5. Agitar por 10 segundos em vórtex;
6. Adicionar 65µL de solução NaCl/CTAB (10% CTAB / 0,7M NaCl);
7. Agitar por 10 segundos em vórtex;
8. Incubar a 65°C durante 10 minutos em termobloco sem agitação;
9. Adicionar 635µL de clorofórmio;
10. Agitar por 10 segundos em vórtex;
11. Centrifugar a 13.000 x g por 5 minutos;
12. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
13. Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio;
14. Agitar por 10 segundos em vórtex;
15. Centrifugar a 13.000 x g por 5 minutos;
16. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500µL, 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 30 minutos;
20. Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar 1000µL de etanol 70% a 5°C;
21. Agitar por 10 segundos em vórtex;
22. Centrifugar a 13.000 x g por 30 minutos;
23. Descartar o sobrenadante por inversão;
24. Secar o sedimento em termobloco sem agitação a 56°C por 10 minutos;
25. Adicionar 30µL de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM 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.

4.7.1.2 Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de Sangue Periférico Total de Cães

Amostras de sangue periférico dos cães foram submetidas ao protocolo de extração descrito por Vieira (2004):

1. Descongelar a temperatura ambiente o sangue estocado a -20°C e a seguir transferir 1,0mL para um microtubo novo;
2. Adicionar 500uL de TE pH 8,0;
3. Agitar por 10 segundos em vórtex;
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 1000µL de TE pH 8,0;
7. Agitar por 10 segundos em vórtex;

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 400µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%; 10µL Proteinase K a 20mg/mL);
12. Seguir exatamente a partir do passo 2, descrito no item 4.7.1.1.

4.7.1.3 Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de Sêmen Canino

O volume de sêmen utilizado para extração de ácido nucléico variou de 100 µL a 1000µL, sendo a extração realizada da seguinte maneira:

1. Descongelar a temperatura ambiente o sêmen estocado a -20°C e a seguir transferir 1,0mL (ou o volume disponível) para um microtubo novo;
2. Adicionar 500uL de TE pH 8,0;
3. Agitar por 10 segundos em vórtex;
4. Centrifugar 13.000 x g por 15 minutos;
5. Descartar o sobrenadante num Becker com uma mistura de água e hipoclorito de sódio a 2,5%;
6. Suspender o sedimento obtido em 400µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%; 10µL Proteinase K a 20mg/mL);

7. 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;
8. Adicionar 500µL de fenol;
9. Agitar por 10 segundos em vórtex;
10. Centrifugar 13.000 x g por 5 minutos;
11. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
12. Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio;
13. Agitar por 10 segundos em vórtex;
14. Centrifugar 13.000 x g por 5 minutos;
15. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
16. Seguir exatamente a partir do passo 17 descrito no item 4.7.1.1.

4.7.1.4 Extração de Ácidos Nucléicos de Amostras de *Swab* Vaginal de Cães

1. Descongelar a temperatura ambiente o *swab* estocado a -20°C e a seguir transferir 1mL (ou o volume disponível) para um microtubo novo;
2. Adicionar 500uL de TE pH 8,0;
3. Agitar por 10 segundos em vórtex;
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. Suspender o sedimento obtido em 400µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%; 10µL Proteinase K a 20mg/mL);
7. Seguir exatamente a partir do passo 7 descrito no item 4.7.1.3.

4.7.2 Reação de Amplificação de Ácidos Nucléicos

4.7.2.1 Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*) Empregados

Foram empregados os *primers* desenhados por Vieira (2004), direcionados à região interespçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*. A seqüência dos *primers* empregados pode ser visualizada no tabela 3.

Tabela 3: Seqüência dos *primers* empregados para o diagnóstico da brucelose canina, direcionados à região interespçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*, São Paulo – 2006

<i>PRIMERS</i>	SEQUÊNCIA
ITS66	5´ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA 3´
ITS279	5´AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC 3´

Os *primers* ITS66 e ITS279 amplificam um fragmento de 214bp e são específicos para bactérias de gênero *Brucella*.

4.7.2.2 Condições de Amplificação de Ácidos Nucléicos

O ciclo empregado foi realizado nas seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por dois minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e aquecimento final a 72°C por cinco minutos. O termociclador utilizado foi da marca MJ Research PTC-200 DNA Engine Version 3.0, Massachusetts, USA.

A concentração dos reagentes foi: 200 µM 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) e água ultra pura.

4.7.2.3 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). 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 µg/mL durante 20 minutos e posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Estas foram comparadas com um padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

4.8 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS *PRIMERS* ITS66 E ITS279 EM AMOSTRAS DE SÊMEN E SWAB VAGINAL EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADAS

A sensibilidade analítica (SAAH; HOOVER, 1997) dos *primers* ITS66 e ITS279 foi avaliada da seguinte maneira: a partir de 30 µL de DNA extraído da *Brucella canis* RM 6/66 com leitura espectrofotométrica na razão 260/280nm de 1,9186 e concentração no valor de 39µg/mL, foram preparadas as seguintes diluições de DNA bacteriano em TE: 39pg/µL; 390fg/µL; 39fg/µL e 3,9fg/µL. A leitura espectrofotométrica foi realizada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, USA)

Um microlitro de cada diluição de DNA bacteriano foi misturado a 4µL de DNA cão obtido de amostras negativas de sêmen e *swab* vaginal (a uma concentração de DNA de 110 µg/mL e 12 µg/mL, respectivamente) de maneira a obter as amostras, em um volume final de 5µL cada.

Amostras de sêmen:

Amostra 1: 39pg de DNA de *Brucella canis* + 440ng de DNA de cão

Amostra 2: 390fg de DNA de *Brucella canis* + 440ng de DNA de cão

Amostra 3: 39fg de DNA de *Brucella canis* + 440ng de DNA de cão

Amostra 4: 3,90fg de DNA de *Brucella canis* + 440ng de DNA de cão

Amostra 5: 440ng de DNA de cão

Amostras de swab vaginal:

Amostra 1: 39pg de DNA de *Brucella canis* + 48ng de DNA de cão

Amostra 2: 390fg de DNA de *Brucella canis* + 48ng de DNA de cão

Amostra 3: 39fg de DNA de *Brucella canis* + 48ng de DNA de cão

Amostra 4: 3,90fg de DNA de *Brucella canis* + 48ng de DNA de cão

Amostra 5: 44ng de DNA de cão

4.9 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS PRIMERS

O DNA extraído oriundo de colônias puras de *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331 foi submetido à reação em cadeia pela polimerase, empregando-se os *primers* ITS66 e ITS279, nas mesmas condições de amplificação descritas no item 4.7.2.2, com o objetivo de avaliar a especificidade analítica dos primers (SAAH; HOOVER, 1997).

4.10 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADOS

Todos os métodos de diagnóstico empregados foram avaliados comparando-se seu desempenho dois a dois.

Foi realizado o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica das provas de SAR, SAR-2ME, IDGA e PCR em amostras de sangue e *swab* vaginal.

4.10.1 Avaliação do Desempenho das Provas de Diagnóstico Empregadas, Comparando-as Duas a Duas

As nove provas de diagnóstico empregadas (SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, cultivo de sêmen, cultivo de *swab* vaginal, PCR em sangue, PCR em sêmen e PCR em *swab* vaginal) foram comparadas duas a duas, empregando-se os seguintes métodos estatísticos:

1. Teste de McNemar: foi empregado para avaliar a igualdade entre as proporções de positividade geradas pelos seis métodos de diagnóstico empregados, comparados dois a dois, em populações relacionadas (PETRIE; WATSON, 1999). O nível de significância adotado foi de 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SPSS 9.0.
2. Coeficiente Kappa: as concordâncias observadas e esperadas foram comparadas empregando-se o indicador Kappa (PETRIE; WATSON, 1999), com auxílio do programa SPSS 9.0.
3. Qui-quadrado com correção de Yates: o teste foi utilizado para avaliar a concordância entre os testes diagnósticos no mesmo indivíduo, assim como para avaliar a igualdade entre as proporções de resultados positivos detectados através de cada um dos seis métodos laboratoriais, nos animais com presença de sinais clínicos ou com ausência de sinais clínicos sugestivos de brucelose (populações independentes) (PETRIE; WATSON, 1999).

4.10.2 Definição do *Gold Standard* e Cálculo da Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica das Provas de Diagnóstico Empregadas

Para definição do *gold standard* foram considerados os seguintes parâmetros: resultado do cultivo microbiológico em amostras de sangue, sêmen e *swab* vaginal, resultado do exame clínico e situação do canil de procedência dos animais (canil com presença ou não de animais com brucelose).

4.10.2.1 Sensibilidade e Especificidade das Provas de Soroaglutinação Rápida (SAR), Soroaglutinação Rápida com 2-Mercaptoetanol (SAR-2ME) e PCR em Amostras de Sangue

Para avaliação do desempenho das provas de SAR, SAR-2ME e PCR em sangue, os 196 cães (145 fêmeas e 51 machos) foram divididos nos 3 grupos:

Grupo 1 (cães infectados por *Brucella canis*): constituído por cães positivos pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue ou sêmen ou *swab* vaginal (n=64)

Grupo 2 (cães não infectados por *Brucella canis*): constituído por cães negativos pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue e de sêmen ou *swab* vaginal e provenientes de canis com ausência de sinais clínicos da infecção e livres de brucelose de acordo com o diagnóstico bacteriológico (n=48)

Grupo 3 (Cães suspeitos da infecção por *Brucella canis*): constituído por cães negativos no cultivo microbiológico em amostras de sangue e sêmen e *swab* vaginal mas provenientes de canis onde houve isolamento de *B. canis* de pelo menos um animal (n=84).

Os grupos 1 e 2 foram utilizados para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica (SAAH; HOOVER, 1997) das provas de SAR, SAR-2ME e PCR em amostras de sangue.

4.10.2.2 Sensibilidade e Especificidade da Técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Para avaliação do desempenho da prova de IDGA, 167 (39 machos e 128 fêmeas) dos 196 cães foram utilizados, os quais foram divididos nos 3 grupos:

Grupo 1 (cães infectados por *Brucella canis*): constituído por cães positivos pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue ou sêmen ou *swab* vaginal (n=56)

Grupo 2 (cães não infectados por *Brucella canis*): constituído por cães negativos pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue e de sêmen ou *swab* vaginal e provenientes de canis com ausência de sinais clínicos da infecção e livres de brucelose de acordo com o diagnóstico bacteriológico (n=43)

Grupo 3 (Cães suspeitos da infecção por *Brucella canis*): constituído por cães negativos no cultivo microbiológico em amostras de sangue e sêmen e *swab* vaginal mas em contato com cães infectados (n=68).

Os grupos 1 e 2 foram utilizados para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica (SAAH; HOOVER, 1997) da prova de IDGA.

4.10.2.3 Sensibilidade e Especificidade da PCR em Amostras de *Swab* Vaginal

Para avaliação do desempenho da PCR em amostras de *swab* vaginal, as 145 fêmeas foram divididas nos 3 grupos:

Grupo 1 (fêmeas infectadas por *Brucella canis*): constituído por fêmeas positivas pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue ou *swab* vaginal (n=50)

Grupo 2 (fêmeas não infectados por *Brucella canis*): constituído por fêmeas negativas pelo cultivo microbiológico em amostras de sangue e *swab* vaginal e provenientes de canis com ausência de sinais clínicos da infecção e livres de brucelose de acordo com o diagnóstico bacteriológico (n=35)

Grupo 3 (fêmeas suspeitas da infecção por *Brucella canis*): constituído por fêmeas negativas no cultivo microbiológico em amostras de sangue e *swab* vaginal mas em contato com cães infectados (n=60).

Os grupos 1 e 2 foram utilizados para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica (SAAH; HOOVER, 1997) da PCR em amostras de *swab* vaginal.

4.10.2.4 Avaliação do Desempenho da PCR em Amostras de Sêmen

Em função do pequeno número de cães machos examinados, os animais não foram divididos em grupos para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR. A avaliação do desempenho da PCR em amostras de sêmen foi realizada comparando seus resultados com os resultados obtidos pelos demais métodos diagnósticos utilizados, dois a dois, empregando os testes de Mc Nemar, Qui-quadrado e Kappa.

5 RESULTADOS

5.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS *PRIMERS* ITS66 E ITS279 EM AMOSTRAS DE SÊMEN E *SWAB* VAGINAL

A Figura 1 ilustra os resultados de sensibilidade analítica da PCR respectivamente em amostras de sêmen e *swab* vaginal experimentalmente contaminadas com quantidades decrescentes de DNA de *Brucella canis* RM 6/66.

A PCR empregando os *primers* ITS66 e ITS279 foi capaz de detectar até 3,9fg de DNA de *B. canis* RM6/66 diluídos respectivamente em 440ng de DNA de cão oriundo de amostra de sêmen canino e 48ng de DNA de cão oriundo de amostra de *swab* vaginal canina.

- 1) padrão de peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases
- 2) 39pg DNA *B. canis* + 440ng DNA cão oriundo de sêmen canino
- 3) 390fg DNA *B. canis* + 440ng DNA cão oriundo de sêmen canino
- 4) 39fg DNA *B. canis* + 440ng DNA cão oriundo de sêmen canino
- 5) 3,9fg DNA *B. canis* + 440ng DNA cão oriundo de sêmen canino
- 6) 440ng de DNA de cão oriundo de sêmen canino
- 7) Controle negativo sem DNA (TE)
- 8) 38pg DNA *B. canis* + TE (controle positivo)
- 9) 39pg DNA *B. canis* + 44ng DNA cão oriundo de *swab* vaginal canino
- 10) 390fg DNA *B. canis* + 44ng DNA cão oriundo de *swab* vaginal canino
- 11) 39fg DNA *B. canis* + 44ng DNA cão oriundo de *swab* vaginal canino
- 12) 3,9fg DNA *B. canis* + 44ng DNA cão oriundo de *swab* vaginal canino
- 13) padrão de peso molecular, múltiplos de 100 pares de bases

Figura – Sensibilidade analítica da PCR utilizando os *primers* ITS66 e ITS279 em amostras de sêmen e *swab* vaginal experimentalmente contaminadas com DNA de *B. canis* RM6/66. São Paulo-2006

5.2 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DOS *PRIMERS* ITS66 E ITS279

A PCR empregando os *primers* ITS66 e ITS279 apresentou boa especificidade analítica, já que nenhum produto amplificado foi observado quando da realização da PCR em amostra de *O. anthropi*, seguindo as mesmas condições utilizadas para amplificação de DNA proveniente de colônias puras de *Brucella* e das amostras clínicas examinadas.

5.3 PROPORÇÕES DE POSITIVOS DETECTADA PELOS MÉTODOS LABORATORIAIS EMPREGADOS

Considerando-se todos os animais examinados (n=196), as proporções de resultados positivos, obtidos em cada um dos seis testes de diagnósticos utilizados podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4- Proporção de resultados positivos detectados pelas provas de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, cultivo de sêmen e *swab* vaginal e PCR em amostras de sangue, sêmen e *swab* vaginal, aplicadas ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*. São Paulo – 2006

SAR	SAR-2ME	IDGA	CULTIVO SANGUE	CULTIVO SÊMEN	CULTIVO SWAB VAGINAL	PCR SANGUE	PCR SÊMEN	PCR SWAB VAGINAL
41,83% (82/196)	14,28% (28/196)	28,14% (47/167)	32,14% (63/196)	19,6% (10/51)	4,82% (7/145)	33,16% (65/196)	33,33% (17/51)	26,89% (39/145)

Nenhum dos 196 animais examinados foi positivo pelo teste do antígeno acidificado tamponado para detecção de anticorpos anti-*Brucella* lisa.

Os resultados obtidos pelos nove testes laboratoriais empregados, em cada um dos animais examinados podem ser observados na tabela 14, apresentada em Anexo.

5.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS, COMPARANDO-AS DUAS A DUAS

A comparação dos resultados obtidos pelas provas de diagnóstico empregadas, avaliados dois a dois pode ser observada na tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação do desempenho das provas de SAR, SAR-2ME, hemocultura, cultivo de sêmen e de *swab* vaginal e PCR em sangue, sêmen e *swab* vaginal, comparando os resultados dois a dois, pelos testes de Mc Nemar, Qui-quadrado e Kappa, São Paulo – 2006

Teste 1	Teste 2	RESULTADOS				Total	KAPPA		TESTE DE Mc NEMAR		QUI-QUADRADO		
		Positivo teste 1 e positivo teste 2	Negativo teste 1 e negativo teste 2	Positivo teste 1 e Negativo teste 2	Negativo teste 1 e Positivo teste 2		Valor	Concor- dância	Valor de p	Concor- dância	Valor de X ²	Valor de p	Associa- ção
SAR	SAR-2ME	28	114	54	0	196	0,376	sofrível	0	não	42,669	0	sim
SAR	IDGA	40	87	33	7	167	0,493	regular	0	não	43,239	0	sim
SAR	Cultivo sangue	51	102	31	12	196	0,534	regular	0,005	não	56,032	0	sim
SAR	PCR sangue	55	104	27	10	196	0,6	regular	0,008	não	70,532	0	sim
SAR	Cultivo <i>swab</i> vaginal	6	77	61	1	145	0,082	ruim	0	não	3,1	0,078	não
SAR	PCR <i>swab</i> vaginal	31	70	36	8	145	0,371	sofrível	0	não	21,976	0	sim
SAR	cultivo sêmen	8	34	7	2	51	0,529	regular	0,18	sim	12,452	0	sim
SAR	PCR sêmen	9	28	6	8	51	0,364	sofrível	0,791	sim	5,206	0,023	sim
SAR-2ME	IDGA	25	118	2	22	167	0,592	regular	0	não	62,404	0	sim
SAR-2ME	Cultivo sangue	27	132	1	36	196	0,493	regular	0	não	58,504	0	sim
SAR-2ME	PCR sangue	26	129	2	39	196	0,449	regular	0	não	49,421	0	sim
SAR-2ME	cultivo <i>swab</i> vaginal	4	118	20	3	145	0,198	fraca	0	não	5,958	0,015	sim
SAR-2ME	PCR <i>swab</i> vaginal	16	98	8	23	145	0,381	sofrível	0,011	não	20,775	0	sim
SAR-2ME	Cultivo sêmen	4	41	0	6	51	0,517	regular	0,031	não	12,692	0	sim
SAR-2ME	PCR sêmen	4	34	0	13	51	0,291	sofrível	0	não	5,731	0,003	sim
IDGA	Cultivo sangue	42	106	5	14	167	0,734	boa	0,064	sim	88,016	0	sim

Tabela 5 - Avaliação do desempenho das provas de SAR, SAR-2ME, hemocultura, cultivo de sêmen e de *swab* vaginal e PCR em sangue, sêmen e *swab* vaginal, comparando os resultados dois a dois, pelos testes de Mc Nemar, Qui-quadrado e Kappa, São Paulo - 2006

Conclusão

		RESULTADOS					KAPPA		TESTE DE Mc NEMAR		QUI-QUADRADO		
Teste 1	Teste 2	Positivo teste 1 e positivo teste 2	Negativo teste 1 e negativo teste 2	Positivo teste 1 e Negativo teste 2	Negativo teste 1 e Positivo teste 2	Total	Valor	Concor- dância	Valor de p	Concor- dância	Valor de X ²	Valor de p	Associa- ção
IDGA	PCR sangue	40	103	7	17	167	0,666	boa	0,064	sim	72,475	0	sim
IDGA	Cultivo <i>swab</i> vaginal	5	89	33	1	128	0,159	fraca	0	não	6,192	0,013	sim
IDGA	PCR <i>swab</i> vaginal	22	74	16	16	128	0,4	sofrível	1	sim	18,723	0	sim
IDGA	Cultivo sêmen	5	29	4	1	39	0,591	regular	0,375	sim	10,769	0,0017	sim
IDGA	PCR sêmen	7	26	2	4	39	0,598	regular	0,688	sim	11,195	0,001	sim
Cultivo sangue	PCR sangue	56	124	7	9	196	0,814	ótima	0,804	sim	126,393	0	sim
Cultivo sangue	cultivo <i>swab</i> vaginal	7	95	43	0	145	0,176	fraca	0	não	11,094	0,001	sim
Cultivo sangue	PCR <i>swab</i> vaginal	27	83	23	12	145	0,436	regular	0,09	sim	26,447	0	sim
Cultivo sangue	cultivo sêmen	9	37	4	1	51	0,721	boa	0,375	sim	23,194	0	sim
Cultivo sangue	PCR sêmen	11	32	2	6	51	0,625	boa	0,289	sim	17,667	0	sim
PCR sangue	cultivo <i>swab</i> vaginal	6	94	44	1	145	0,137	fraca	0	não	6,328	0,012	sim
PCR sangue	PCR <i>swab</i> vaginal	24	80	26	15	145	0,34	sofrível	0,117	sim	15,686	0	sim
PCR sangue	cultivo sêmen	9	35	6	1	51	0,634	boa	0,125	sim	18,514	0	sim
PCR sangue	PCR sêmen	10	29	5	7	51	0,455	regular	0,774	sim	8,606	0,003	sim
Cultivo <i>swab</i> vaginal	PCR <i>swab</i> vaginal	6	105	1	33	145	0,195	fraca	0	não	9,989	0,002	sim
Cultivo sêmen	PCR sêmen	10	34	0	7	51	0,656	boa	0,016	não	21,286	0	sim

5.5 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS PROVAS DE DIAGNÓSTICO EMPREGADAS

5.5.1 Cálculo da Sensibilidade e Especificidade das Provas Sorológicas (SAR, SAR-2ME e IDGA)

A sensibilidade e especificidade diagnóstica das provas de SAR, SAR-2ME e IDGA foram calculadas de acordo com os grupos 1 e 2, descritos nos itens 4.10.2.1 e 4.10.2.2 e podem ser observadas respectivamente nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de soroaglutinação rápida em placa (SAR), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*, São Paulo – 2006

		CONDIÇÃO		Total
		Infectado	Não infectado	
SAR	Positivo	52	9	61
	Negativo	12	39	51
	Total	64	48	112

Sensibilidade diagnóstica: 81,25%

Especificidade diagnóstica: 81,25%

Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de soroaglutinação rápida em placa com 2-mercaptoetanol (SAR-2ME), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*, São Paulo – 2006

		CONDIÇÃO		Total
		Infectado	Não infectado	
SAR-2ME	Positivo	27	0	27
	Negativo	37	48	85
	Total	64	48	112

Sensibilidade diagnóstica: 42,18%

Especificidade diagnóstica: 100%

Tabela 8 - Sensibilidade e especificidade diagnóstica da prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis* São Paulo – 2006

		CONDIÇÃO		Total
		Infectado	Não infectado	
IDGA	Positivo	42	0	42
	Negativo	14	43	57
	Total	56	43	99

Sensibilidade diagnóstica: 75%

Especificidade diagnóstica: 100%

Dentre os animais considerados suspeitos de brucelose, de acordo com os parâmetros descritos nos itens 4.10.2.1 e 4.10.2.2; 25 % (21/84) foram positivos na prova de SAR; 1,19% (1/84) foram positivos pela prova de SAR-2ME e 7,35% (5/68) foram positivos pela IDGA.

5.5.2 Cálculo da Sensibilidade e Especificidade da PCR Aplicada em Amostras de Sangue e *Swab* Vaginal de Cães

A sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de sangue foram calculadas de acordo com os grupos 1 e 2, descritos no item 4.10.2.1 e podem ser observadas na tabela 9.

Tabela 9- Sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de sangue, aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*, São Paulo - 2006.

		CONDIÇÃO		Total
		Infectado	Não infectado	
PCR sangue	Positivo	57	1	58
	Negativo	7	47	54
	Total	64	48	112

Sensibilidade diagnóstica: 89,06%

Especificidade diagnóstica: 97,91%

Dentre os animais considerados suspeitos de brucelose, de acordo com os parâmetros descritos no item 4.10.2.1; 8,33 % (7/84) foram positivos na PCR em amostras de sangue.

A sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de *swab* vaginal foram calculadas de acordo com os grupos 1 e 2, descritos no item 10.2.3 e podem ser observadas na tabela 10.

Tabela 10- Sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em amostras de *swab* vaginal, aplicada ao diagnóstico da brucelose canina causada por *Brucella canis*, São Paulo – 2006

		CONDIÇÃO		Total
		Infectado	Não infectado	
PCR <i>swab</i> vaginal	Positivo	27	1	28
	Negativo	23	34	57
	Total	50	35	85

Sensibilidade diagnóstica: 54%

Especificidade diagnóstica: 97,14%

Dentre as fêmeas consideradas suspeitas de brucelose, de acordo com os parâmetros descritos no item 4.10.2.3; 18,33 % (11/60) foram positivas na PCR em amostras de *swab* vaginal.

5.5.3 Avaliação do Desempenho da PCR Aplicada em Amostras de Sêmen Canino

A avaliação da PCR em amostras de sêmen foi realizada comparando seu desempenho com o desempenho das provas de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura e cultivo microbiológico de sêmen, duas a duas. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

5.6 Avaliação das proporções de positivos diagnosticadas pelos testes laboratoriais utilizados nos cães com presença e ausência de sinais clínicos de brucelose

As proporções de resultados positivos obtidos pelas técnicas de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, PCR em sangue e cultivo de *swab* vaginal foram maiores dentre os animais que apresentaram sinais clínicos sugestivos de brucelose ($p < 0,05$).

Já o cultivo microbiológico de sêmen e a PCR em amostras de sêmen e *swab* vaginal não apresentaram diferenças nas proporções de positivos entre os animais com presença e ausência de sinais clínicos.

As proporções de machos e fêmeas positivos pelos testes de diagnóstico empregados, em relação à condição clínica podem ser verificadas respectivamente nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Proporções de cães machos positivos diagnosticados pelos testes de SAR, SAR-2ME, IDGA, cultivo de sangue e sêmen e PCR em sangue e sêmen, em relação à condição clínica. São Paulo – 2006

Condição Clínica	Número de cães*	NÚMERO DE CÃES POSITIVOS NOS TESTES LABORATORIAIS**						
		SAR	SAR-2ME	IDGA	Cultivo sangue	Cultivo sêmen	PCR sangue	PCR sêmen
Ausência de sinais clínicos	45	13	4	3	12	8	11	10
Aumento de linfonodos	2	0	0	1	1	1	0	1
Aumento do volume testicular	5	2	0	1	0	1	2	2
Aumento do volume de epidídimos	1	0	0	1	0	0	0	1

* Número de cães positivos para cada condição clínica considerada

** Número de positivos em cada teste de diagnóstico laboratorial, relativos a cada condição clínica

Tabela 12 - Proporções de cadelas positivas diagnosticadas pelos testes de SAR, SAR 2ME, IDGA, cultivo de sangue e *swab* vaginal e PCR em sangue e *swab* vaginal, em relação à condição clínica, São Paulo – 2006

Condição Clínica	Número de cães*	NÚMERO DE CÃES POSITIVOS NOS TESTES LABORATORIAIS**						
		SAR	SAR-2ME	IDGA	Cultivo sangue	Cultivo <i>swab</i> vaginal	PCR sangue	PCR <i>swab</i> vaginal
Ausência de sinais clínicos	101	40	9	19	25	0	25	25
Abortamento	23	19	11	12	17	5	17	10
Aumento de linfonodos	13	7	6	7	8	2	7	5
Falha de concepção	9	6	2	3	3	0	4	0
Filhotes fracos	0	0	0	0	0	0	0	0
Natimortos	2	2	1	2	2	1	2	1
Secreção vaginal***	19	9	6	9	11	7	10	9
Discoespondilite	0	0	0	0	0	0	0	0

* Número de cães positivos para cada condição clínica considerada

** Número de positivos em cada teste de diagnóstico laboratorial, relativos a cada condição clínica

*** Animais com secreção vaginal proveniente de estro e período pós-parto não foram considerados

6. DISCUSSÃO

6.1. SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA PCR

Existem relatos de baixa sensibilidade da PCR aplicada à detecção de *Brucella* spp. em amostras puras de sêmen ovino e bovino, em decorrência da presença de inibidores que impedem a reação de amplificação. Sugere-se que elevadas concentrações de DNA do hospedeiro possam atuar como inibidores da reação (AMIN; HAMDY; IBRAHIM, 2001; COGSWELL et al., 1996). As brucelas encontram-se livres no fluido seminal, ou seja, na fração não espermática do sêmen (CAMPERO et al., 1990), assim protocolos de purificação das amostras de sêmen previamente à extração de DNA têm sido adotados com o objetivo de aumentar a sensibilidade da PCR na detecção de *Brucella* em bovinos e ovinos. Estes processos de purificação consistem no fracionamento das amostras de sêmen bovino e ovino em fluido seminal, fração composta por células não espermáticas e fração composta por células espermáticas, para posterior extração de DNA e realização da PCR (VON BEROLDINGEN et al., 1990).

Amin; Hamdy e Ibrahim (2001) fracionaram amostras de sêmen provenientes de bovinos e ovinos de acordo com o protocolo de purificação descrito por (VON BEROLDINGEN et al., 1990) e posteriormente submeterem estas amostras à extração de ácidos nucleicos e PCR para detecção de DNA de *B. melitensis*. A extração de DNA foi realizada a partir de 100µl de amostra de cada fração seminal. Amostras de sêmen puras (não fracionadas) também foram testadas. Observou-se que não houve detecção de DNA de *B. melitensis* na fração composta por células espermáticas, nem em amostras de sêmen puras. A detecção de DNA pela PCR só foi possível em amostras compostas apenas de fluido seminal.

A contaminação experimental das diferentes frações celulares do sêmen com DNA de *B. melitensis*, resultou na ausência de amplificação na fração espermática, sugerindo a existência de inibidores (possivelmente altas concentrações de DNA do hospedeiro) da PCR nestas frações das amostras (AMIN; HAMDY; IBRAHIM, 2001).

No presente trabalho, a sensibilidade analítica dos *primers* não foi afetada pela presença de DNA genômico canino oriundo de sêmen nas amostras contendo DNA de *Brucella*. A PCR empregando os *primers* ITS foi capaz de detectar 3,9fg de DNA bacteriano, o que corresponde ao material genético de duas bactérias (BAILY et al., 1992), em amostras puras de sêmen contendo 440ng de DNA genômico canino.

Em amostras de sangue, elevadas concentrações de DNA do hospedeiro nas amostras clínicas também podem levar a inibição da PCR (MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; NAVARRO et al., 2002; ZERVA et al., 2001). Navarro et al. (2002) compararam três diferentes protocolos de PCR para detecção de DNA de *Brucella* spp. em amostras de sangue humano e determinaram se a presença de DNA genômico em altas concentrações poderia reduzir a sensibilidade da PCR, empregando três pares de *primers*. O par de *primers* mais sensível foi o F4/R2 (direcionado ao DNA codificador do RNA ribossomal 16S), que permitiu a amplificação de até 8fg de DNA purificado de *B. melitensis*. Os *primers* B4/B5 e JPF/JPR (direcionados respectivamente ao gene codificador da proteína periplásmica de 31kDa e ao gene *omp2*), amplificaram respectivamente 5 e 20 pg de DNA genômico de *B. melitensis* purificado. A sensibilidade analítica da PCR empregando os *primers* F4/R2 e B4/B5 foi reduzida de 8 para 800fg e de 5 para 50pg respectivamente, na presença de 200ng de DNA genômico humano.

De acordo com Morata; Queipo-Ortuño e Colmenero (1998) quantidades de DNA por PCR maiores do que 4µg podem levar a inibição. Vieira (2004) avaliaram a influência de DNA genômico canino na PCR para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue total

de cães e observou amplificação de até 3,8fg de DNA de *Brucella* spp em presença de 450ng de DNA genômico canino. Conclui-se que dentro de certos limites, a presença de DNA do hospedeiro não é deletéria à reação de amplificação.

Outros compostos como o grupo heme, EDTA e heparina são considerados potencialmente inibidores da reação de amplificação (MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1999).

No presente estudo, foi utilizado citrato de sódio como anticoagulante para evitar os efeitos deletérios da heparina ou do EDTA. Além disso, foram realizadas lavagens no *pellet* de leucócitos com tampão TE previamente à extração de DNA, para reduzir o efeito inibitório do grupo heme das hemácias (MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; VIEIRA, 2004).

A PCR aplicada às amostras de *swab* vaginal também permitiu a detecção de até 3,9fg de DNA bacteriano. Amostras de *swab* vaginal apresentam pequena quantidade de células do hospedeiro, quando comparadas às demais (sangue e sêmen) sendo, portanto menos sujeitas à inibição.

6.2. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DA PCR

Os *primers* ITS66 e ITS279 foram desenhados com o objetivo de auxiliar na detecção de *Brucella* em cães, permitindo a amplificação de DNA proveniente de qualquer espécie e biótipo de *Brucella*, mas não de agentes genotipicamente semelhantes, como *Bartonella bacilliformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Acetobacter aceti*, *Mesorhizobium mediterraneum* e *Ochrobactrum anthropi* (VIEIRA, 2004).

Dos microrganismos citados acima, o *Ochrobactrum anthropi* é o que apresenta maior similaridade com as bactérias do gênero *Brucella* assim, na tentativa de evitar reações

cruzadas, os *primers* foram desenhados de maneira que o sítio de hibridização do *primer* ITS66 é idêntico em *Brucella* e *Ochrobactrum*, enquanto o *primer* ITS279 hibridiza-se especificamente a *Brucella* (VIEIRA, 2004).

Empregando-se os mesmos protocolos adotados para amplificação de DNA de *Brucella*, os *primers* ITS66 e ITS279 não amplificaram sequências gênicas de *O. anthropi*, apresentando boa especificidade analítica.

6.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DOS TESTES SOROLÓGICOS (SAR, SAR-2ME E IDGA)

Dos três testes sorológicos utilizados, a SAR apresentou maior sensibilidade diagnóstica, seguida pela IDGA e SAR-2ME de acordo com o *gold standard* descrito nos itens 4.10.2.1 e 4.10.2.2.

Doze cães foram negativos na SAR apesar de infectados, sendo que nove foram positivos apenas pela hemocultura, um positivo pela hemocultura e cultivo de sêmen e dois positivos pela hemocultura e cultivo de *swab* vaginal.

Quatorze cães infectados foram negativos na IDGA, sendo 12 positivos apenas pela hemocultura, um positivo pela hemocultura e cultivo de sêmen e um positivo pela hemocultura e cultivo de *swab* vaginal.

Trinta e sete cães infectados foram negativos na SAR-2ME, sendo três positivos na hemocultura e no cultivo de *swab* vaginal, cinco positivos na hemocultura e no cultivo de sêmen, 28 positivos apenas na hemocultura e um animal positivo apenas no cultivo de sêmen.

A ocorrência de resultados negativos nos testes sorológicos em cães infectados que se apresentam em bacteremia pode indicar a fase inicial da infecção em que os títulos de anticorpos apresentam-se em níveis não detectáveis pelos testes sorológicos, apesar da

presença de bacteremia. Nos cães, a bacteremia inicia-se entre uma e quatro semanas pós-infecção, mas em geral, os testes sorológicos são negativos durante as primeiras quatro a oito semanas pela SAR, e oito a 12 semanas pela IDGA (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; GEORGE; CARMICHAEL, 1974, 1978; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Quando o 2-mercaptoetanol é empregado nas provas de aglutinação, os títulos de anticorpos também são detectados em período mais tardio (entre oito e 12 semanas pós-infecção), o que pode resultar em resultados falso-negativos durante um período mais prolongado (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; JOHNSON; WALKER, 1992; MEGID et al., 2000). Cães positivos pela hemocultura, porém negativos pela SAR-2ME podem apresentar anticorpos circulantes predominantemente da classe IgM enquanto que as IgG ainda não se apresentam em níveis séricos detectáveis (BADAKHASH et al., 1982). Saegusa et al. (1978) também observaram cães negativos pela SAL e pela SAL-2ME porém em bacteremia.

Nicoletti e Chase (1987), ao compararem os resultados obtidos pelas provas de SAR, SAL e IDGA com a hemocultura, não observaram a presença de cães positivos pela hemocultura e negativos pela SAR. Já em relação à IDGA, quatro de 31 cães positivos pela hemocultura, foram negativos pela IDGA. Iribarren et al. (1999) submeteram 38 cães que foram positivos pela SAR e IDGA à hemocultura, e observaram 37 (94,8%) positivos.

No presente trabalho, um cão macho apresentou-se positivo pela SAR, negativo pela SAR-2ME, negativo na hemocultura e positivo no cultivo de sêmen, o que pode indicar uma fase mais tardia da infecção, com ausência de bacteremia, mas persistência do agente em tecidos reprodutivos, ocorrendo eliminação de *B. canis* pelo sêmen (CARMICHAEL, 1976,

1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE; KAKUK, 1969; SAEGUSA et al., 1978; SCHOEB; MORTON, 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; SPINK, 1970; UEDA et al., 1974a ,b; ZAMORA; ALONSO; MARTIN, 1980).

A prova de SAR apresentou especificidade diagnóstica de 71,42%. Dos 48 cães considerados não infectados, nove foram positivos pela SAR, o que pode ocorrer em decorrência da detecção de anticorpos não específicos (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; CARMICHAEL; JOUBERT; JONES, 1989; CARMICHAEL; SHIN, 1996; GONZÁLEZ et al., 2004; IRIBARREN et al., 1999; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE; GUPTA, 1970; PICKERILL, 1970; ZOHA; CARMICHAEL, 1982). Os nove animais não apresentaram sinais clínicos sugestivos de brucelose, eram negativos no cultivo microbiológico e provenientes de canis que não apresentavam problemas reprodutivos e nos quais a infecção não foi detectada por meio de métodos bacteriológicos. Esses dados reforçam a hipótese de ocorrência de reações cruzadas na SAR.

A ocorrência de resultados positivos pela SAR que não são confirmados por outros testes sorológicos nem pela hemocultura, são comumente relatados (IRIBARREN et al., 1999; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; SAEGUSA et al., 1978). Outra explicação para a existência de cães positivos pela SAR, porém negativos pelos métodos diretos de diagnóstico seria a presença de cães em bacteremia intermitente (GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979) ou numa fase tardia da infecção, mas com anticorpos circulantes em níveis detectáveis (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990;

CARMICHAEL; KENNEY, 1968; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; GONZÁLEZ et al., 2004; LARSSON; COSTA, 1980; LARSSON et al., 1984; MOORE; KAKUK, 1969; NICOLETTI; CHASE, 1987; SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; UEDA et al., 1974a,b; ZAMORA; ALONSO; MARTIN, 1980; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Carmichael e Zoha (1982), Saegusa et al. (1978), Serikawa e Muraguchi (1979) e Ueda et al. (1974) descreveram a ocorrência de animais machos sorologicamente positivos, negativos pela hemocultura, porém com persistência do agente em próstata. A ocorrência de cães com altos títulos de anticorpos detectados pela SAL, negativos na hemocultura, porém com isolamento de *B. canis* de diversos órgãos, como fígado, baço, linfonodos e próstata também foi observada (SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977), assim como o isolamento de *B. canis* de amostras de urina e próstata de um cão positivo pela prova de SAL e em ausência de bacteremia há 56 dias (MOORE; KAKUK, 1969).

Nenhum dos animais pertencentes ao grupo não infectado apresentou-se positivo pelas provas de SAR-2ME e IDGA (especificidade diagnóstica de 100%).

O 2-mercaptoetanol é utilizado na prova de SAR com o objetivo de aumentar a especificidade diagnóstica do teste, uma vez que permite a detecção apenas de IgM (BADAKHSH; CARMICHAEL; DOUGLASS, 1982; CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON; WALKER, 1992; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977). Porém, a ocorrência de reações inespecíficas, mesmo após o emprego do 2-mercaptoetanol foram verificadas, preconizando-se o teste de SAR-2ME como método de triagem (BADAKHSH; CARMICHAEL; DOUGLASS et al., 1982; CARMICHAEL, 1976, 1979, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; SHIN, 1996; JOHNSON;

WALKER, 1992; NICOLETTI; CHASE, 1987; SAEGUSA et al., 1978). No presente trabalho uma elevada porcentagem (57,81%) dos animais infectados (grupo 1), que apresentaram-se positivos pelo cultivo microbiológico, foram negativos pela SAR-2ME, sugerindo que a adição do 2-mercaptoetanol leva ao aumento da especificidade do teste, ocorrendo porém uma redução significativa da sua sensibilidade diagnóstica

De acordo com Hubbert; Bech-Nielsen e Barta (1980), em 14,5% dos cães positivos pela SAR a infecção não foi confirmada pela SAR-2ME. Mateu-de-Antonio; Martin e Casal (1994) também relataram uma significativa redução no número de cães positivos pela SAR quando do emprego do 2-mercaptoetanol. Azevedo et al. (2004), Keid. (2001) e Moraes (2000) compararam os resultados da IDGA e IDGA-2ME (imunodifusão após tratamento do soro com 2-mercaptoetanol) para o diagnóstico da brucelose canina e também observaram um acentuado declínio na proporção de positivos após o tratamento dos soros com 2-mercaptoetanol.

A prova de IDGA baseada em antígenos superficiais também tem sido apontada como prova de triagem, por apresentar elevada sensibilidade e baixa especificidade diagnóstica (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; JOUBERT; JONES, 1989; CARMICHAEL; SHIN, 1996; IRIBARREN et al., 1999; JOHNSON; WALKER, 1992; KEID, 2001; KEID et al., 2004a; MATEU-DE-ANTONIO; MARTIN; SOLER, 1993; ZOHA; CARMICHAEL, 1982). No presente trabalho, o teste de IDGA apresentou-se útil como método confirmatório de diagnóstico em função da elevada especificidade observada. Porém, sua utilização como método de triagem deve ser realizada com cautela, já que 25% (14/56) dos cães infectados não foram diagnosticados como positivos. Flores-Castro e Carmichael (1978) também observaram que a proporção de positivos detectada pela IDGA foi inferior a SAR. Por outro lado, Iribarren et al. (1999) observaram semelhantes proporções de

positivos detectadas pela SAR (utilizando *B. canis* como antígeno) e IDGA (utilizando *B. ovis* como antígeno) e maior sensibilidade da IDGA em relação à hemocultura.

Avaliando-se os testes sorológicos no grupo de animais considerados suspeitos de brucelose (grupo 3), observou-se o seguinte: dos 84 cães com suspeita da infecção, 21 foram positivos pela SAR, um pela SAR-2ME e cinco pela IDGA. Estes animais foram classificados como suspeitos por se apresentarem negativos pelo cultivo microbiológico, porém com presença de sinais clínicos sugestivos de brucelose ou por serem procedentes de canis nos quais foi isolada *B. canis* de pelo menos um animal. Tendo em vista a elevada especificidade diagnóstica das provas de SAR-2ME e IDGA, estes animais possivelmente apresentavam-se infectados, em ausência de bacteremia e ausência de eliminação do agente via sêmen ou secreção vaginal.

Ainda no grupo de animais suspeitos, dezesseis foram positivos apenas pelas SAR (negativos pela SAR-2ME e IDGA). Apesar dos relatos de reações inespecíficas pela SAR (FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; IRIBARREN et al., 1999; MYERS; VARELA-DIAZ, 1980; SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977), neste caso, a procedência dos animais sugere que estejam infectados (todos foram provenientes de canis infectados e três apresentaram sinais clínicos de brucelose).

No caso dos animais suspeitos, porém negativos pelos três testes sorológicos a possibilidade de infecção também não deve ser descartada, em decorrência dos resultados falso-negativos apresentados pelos testes sorológicos, característicos de animais em fase inicial ou na fase crônica da infecção.

Em relação a IDGA, foram relatados valores de sensibilidade superiores e de especificidade inferiores aos descritos no presente trabalho, por Keid (2001) e Keid et al. (2004a), empregando a hemocultura como teste *gold standard*.

6.4 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DA PCR APLICADA EM AMOSTRAS DE SANGUE

A PCR empregada em amostras de sangue deixou de detectar DNA de *Brucella* em sete de 64 cães infectados, levando a uma sensibilidade diagnóstica de 89,06%. Os sete animais pertencentes ao grupo de cães infectados foram positivos pela hemocultura, sendo que dois deles apresentaram-se também positivos pelo cultivo de amostras do trato reprodutor.

A ocorrência de sete cães negativos pela PCR, porém positivos pela hemocultura pode ser consequência da presença de inibidores nestas amostras.

A especificidade da PCR em amostras de sangue foi de 97,91%. Apenas um cão pertencente ao grupo de animais não infectados foi positivo pela PCR. Esta aparente perda de especificidade deve ser analisada com cautela, pois apesar do animal ser proveniente de um canil com ausência de sinais clínicos de brucelose e no qual não houve isolamento do agente, ele apresentou-se positivo pela SAR. Além disso, outros animais pertencentes ao mesmo canil também foram positivos pela prova de SAR. Este resultado poderia indicar uma infecção tardia, em que o indivíduo apresenta-se positivo sorologicamente, mas com baixos níveis de microrganismos circulantes, detectáveis pela PCR, mas não detectáveis pela hemocultura.

A detecção de DNA específico de *Brucella* em amostras clínicas não necessariamente indica a presença de infecção ativa, já que a PCR não permite a identificação de DNA proveniente de microrganismos viáveis e não viáveis. Este tipo de abordagem poderia explicar o resultado positivo apesar da ausência de sintomas (NAVARRO; CASAO; SOLERA, 2004).

Dos 84 cães pertencentes ao grupo de animais suspeitos de brucelose, sete foram positivos pela PCR em sangue, sendo que destes, cinco foram positivos em pelo menos um dos testes sorológicos utilizados e apresentavam sinais clínicos da infecção ou pertenciam a

canis positivos. Dois animais foram positivos apenas na PCR e negativos em todos os testes sorológicos, mas tiveram contato com cães infectados.

A ocorrência de cães positivos pela PCR e negativos pela hemocultura pode ser consequência da presença de *Brucella* não viáveis nas amostras clínicas ou ainda da presença de pequeno número circulante de microrganismos, não detectáveis pelo cultivo microbiológico. A infecção por outras espécies de *Brucella*, que requerem atmosfera de microaerofilia para crescimento (como alguns biótipos de *B. abortus*) (FORBES, 1990; MORSE et al., 1953; PRIOR, 1976; TAYLOR; RENTON; MCGREGOR, 1975) poderia ser outra explicação, já que as amostras de sangue foram incubadas apenas em atmosfera de aerobiose. Porém, todos os animais foram negativos pelo teste do antígeno acidificado tamponado, eram provenientes de canis localizados em região urbana e o contato com animais de produção, bem como o consumo de produtos de origem animal não foi relatado.

Valores variáveis de sensibilidade e especificidade foram relatados na PCR em amostras de sangue, de acordo com os diferentes protocolos de extração e amplificação de DNA empregados, diferentes *primers* escolhidos e ainda com *gold standard* adotado (tabela 13).

Tabela 13 - Valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR aplicada em amostras de sangue para a detecção de DNA de *Brucella* spp. em diferentes espécies de hospedeiros e de acordo com diferentes protocolos. São Paulo – 2006

AUTOR	ESPÉCIE ANIMAL	GOLD SATNDARD	PRIMERS	GENE ALVO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
Leal-Klevezas et al., 1995	Caprinos n = 43	Hemocultura E Sorologia (TRB/TFC)	JPF JPR	<i>omp-2</i>	63%	100%
Matar et al., 1996 *	Humanos n=50	Sinais clínicos E Sorologia (SAT)	B4 B5	Proteína de 31kDa de <i>B. abortus</i>	100%	100%
Queipo-Ortuño et al., 1997	Humanos n=110	Sorologia (SAT e Teste de Coombs)	B4 B5	Proteína de 31kDa de <i>B. abortus</i>	100%	98.3%
Navarro et al., 1999	Humanos n=15	Hemocultura OU Sorologia (SAT)	B4 B5	Proteína de 31kDa de <i>B. abortus</i>	50%	60%
Zerva et al., 2001	Humanos n=76	Hemocultura OU Sorologia (SAT)	B4 B5	Proteína de 31kDa de <i>B. abortus</i>	61%	100%
Al-Nakkas et al., 2002 *	Humanos n=84	Sorologia (SAT e ELISA)	O1/O2 I1/I2	IS711	100%	100%
Nimri, 2003	Humans n=70	Hemocultura E Sorologia (RBT)	F4 R2	16S rDNA de <i>B. abortus</i>	100%	100%
Al-Nakkas et al., 2005 *	Humanos n=333	Sorologia (SAT e ELISA) E Hemocultura	O1/O2 I1/I2	IS711	100%	100%
Elfaki et al., 2005a	Humanos n=20	Sinais clínicos E Sorologia (RBT)	B4 B5	Proteína de 31kDa de <i>B. abortus</i>	70%	100%

RBT: Teste Rosa Bengala

CFT: Teste de Fixação do Complemento

SAT: Soroaglutinação em Tubos

* Nested PCR

6.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA DA PCR APLICADA EM AMOSTRAS DE *SWAB* VAGINAL

A sensibilidade da PCR em amostras de *swab* vaginal foi de 54%. Dentre as 50 fêmeas infectadas (positivas pela hemocultura), 23 foram negativas pela PCR em amostras de *swab* vaginal, o que indica a ocorrência de animais em bacteremia, porém com ausência de eliminação vaginal de *B. canis*.

Dentre as fêmeas infectadas (Grupo 1), vinte e sete fêmeas foram positivas pela PCR, das quais seis foram positivas pela hemocultura e pelo cultivo microbiológico de *swab* vaginal e 21 apenas pela hemocultura.

Nas fêmeas infectadas, houve um maior número de isolamentos de *B. canis* a partir de amostras de sangue (50 isolados), quando comparado às amostras de *swab* vaginal (sete isolados). A elevada porcentagem de isolamentos em amostras de sangue é esperada, em decorrência do prolongado período de bacteremia característico da brucelose canina, quando o número de microrganismos circulantes é elevado (CARMICHAEL, 1976, 1990; CARMICHAEL; ZOHA; FLORES-CASTRO, 1984; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; SHIN, 1996; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; IRIBARREN et al., 1999; JOHNSON; WALKER, 1992; KEID, 2001; LARSSON; COSTA, 1980; MOORE, 1969; MOORE; GUPTA, 1970; PILLAI; NEDUNCHELLIYAN; RAGHAVAN, 1991; SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; SPINK, 1970; UEDA et al., 1974a,b). Durante o período de bacteremia, há disseminação bacteriana para diversos órgãos e maior chance de eliminação bacteriana no ambiente. Apesar disso, houve pequeno número de isolamentos em amostras de *swab* vaginal, possivelmente porque poucas cadelas estavam no período pós-abortamento e considera-se que o útero de cadelas em período de quiescência

reprodutiva não constitui um sítio de persistência e multiplicação bacteriana (CICUTA; MIRANDA, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992).

A maior porcentagem de isolamentos em amostras de sangue também pode ser consequência da realização de enriquecimento destas amostras, as quais são incubadas em caldo fosfato triptose, previamente ao repique em placas de ágar triptose. O enriquecimento em meio líquido foi possível devido à ausência de microrganismos contaminantes neste tipo de amostra, quando o sangue é colhido adequadamente. Já as amostras de *swab* vaginal colhidas foram diretamente semeadas em placas contendo ágar triptose com mistura de antibióticos. Em função da elevada contaminação bacteriana secundária neste tipo de material, a realização de enriquecimento prévio em meio líquido torna-se inviável, mesmo com o emprego de meio seletivo.

A especificidade da PCR em amostras de *swab* vaginal foi de 97,14%. Uma fêmea pertencente ao grupo de animais não infectados foi positiva pela PCR, apesar de negativa sorologicamente, da ausência de sinais clínicos da infecção e da ausência de contato com animais infectados. O animal apresentava-se negativo sorologicamente e pertencia a um canil onde não foram identificados cães positivos sorologicamente. Um animal nestas condições pode ter sido infectado e apresentar-se em processo de recuperação da infecção, eliminando microrganismos não viáveis ou em pequenas quantidades por via vaginal (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990, MOORE; KAKUK, 1969; MOORE; GUPTA, 1970).

Moore e Kakuk (1969) realizaram necrópsia em seis cães sorologicamente positivos, após períodos de observação que variaram de 6 a 245 dias. Nenhum dos seis animais apresentou bacteremia durante o período de estudo. Todos os animais apresentaram alterações patológicas sugestivas de brucelose em tecidos como linfonodos, tecidos reprodutivos, rins e fígado, porém não houve isolamento de *Brucella canis* em nenhum dos tecidos avaliados.

Uma explicação para estes resultados seria recuperação espontânea da infecção. Serikawa; Muraguchi e Nakao (1977) também observaram cães com altos títulos de anticorpos séricos, mas negativos bacteriologicamente em amostras de sangue e tecidos.

No grupo de animais suspeitos da infecção, 11 fêmeas foram positivas pela PCR em *swab* vaginal, das quais seis foram positivas pela SAR. Cinco animais foram positivos apenas pela PCR em amostras de *swab* vaginal, apesar de negativas sorologicamente e bacteriologicamente.

A presença de fêmeas positivas pela PCR em *swab* vaginal, porém negativas sorologicamente pode ser esperada, já que altos títulos aglutinantes em geral são elevados durante o período de bacteremia, os quais diminuem rapidamente depois de cessada a bacteremia (UEDA et al., 1974 a,b). Anticorpos específicos podem então persistir em níveis não detectáveis por períodos variáveis e o agente pode manter-se alojado em sítios tissulares, apesar dos animais apresentarem-se negativos nos testes sorológicos e na hemocultura (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL, 1978; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; LARSSON; COSTA, 1980; LARSSON et al., 1984; MOORE; KAKUK, 1969; NICOLETTI; CHASE, 1987; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; SAEGUSA et al., 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; YAMAGUCHI et al., 1974; ZAMORA; ALONSO; MARTIN, 1980; ZOHA; CARMICHAEL, 1982).

Comparando o desempenho da PCR com o cultivo microbiológico de *swab* vaginal em todas as fêmeas examinadas (n=145) observa-se uma maior porcentagem de positivos detectada pela PCR, o que também pode ser observado em trabalhos anteriores (KEID, 2001). Uma elevada concentração de microrganismos, detectável pelos métodos bacteriológicos de diagnóstico, é eliminada por via vaginal apenas durante o período pós-abortamento. De fato,

todas as fêmeas positivas pelo cultivo de *swab* vaginal apresentavam secreção vaginal e encontravam-se em período pós-abortamento (até seis semanas após o abortamento) (CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CICUTA; MIRANDA, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; MOORE, 1969;).

Considerando-se ainda todas as fêmeas examinadas (n=145), a PCR permitiu a detecção de DNA de *Brucella* em amostras de *swab* vaginal provenientes de animais nas seguintes condições: uma cadela que apresentava secreção vaginal decorrente do período de estro; oito cadelas com secreção pós-abortamento; duas fêmeas com secreção vaginal característica do período pós-parto; uma fêmea que apresentava secreção vaginal purulenta ou sanguinolenta; e em 28 cadelas nas quais não foi observada secreção vaginal no momento da colheita (destas 28, duas haviam acasalado há 15 dias e uma há 45 dias). Estes resultados indicam que a eliminação de *Brucella* pode ocorrer em baixos níveis por via vaginal em cadelas em bacteremia mesmo quando a secreção vaginal não é detectável.

Das 28 fêmeas com ausência de secreção vaginal no momento da colheita, mas foram positivas pela PCR, cinco não apresentaram resultado positivo por nenhum outro método de diagnóstico utilizado nem tinham sintomas da infecção, mas eram provenientes de canis infectados (Grupo de animais suspeitos).

Estes resultados podem estar associados à presença de *Brucella* em tecidos reprodutivos, mesmo em cadelas não gestantes e na ausência de bacteremia, sendo o agente eliminado por via vaginal.

Apesar do útero não ser considerado um sítio de persistência bacteriana em cadelas não gestantes (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992), o isolamento de *Brucella canis* de abscesso de coto uterino de fêmea castrada (DILLON; HENDERSON, 1981) e do útero de cadelas não gestantes (SERIKAWA; MURAGUCHI;

NAKAO, 1977) foram relatados. Além disso, casos de endometrite foram descritos em cadelas cronicamente infectadas (CARMICHAEL, 1990).

Carmichael e Kenney (1968) não tiveram sucesso no isolamento de *B. canis* da vagina, mas conseguiram isolar *B. canis* em pequena quantidade de tecidos uterinos macerados e de material mucóide provenientes de cistos endometriais de fêmeas não gestantes que estavam em bacteremia, sugerindo que o agente pode persistir no útero de cadelas não gestantes e que sua eliminação pode ocorrer por via vaginal em pequena quantidade, detectável pela PCR.

Uma outra possibilidade de interpretação destes resultados seria a eliminação urinária do agente, o qual seria detectado pela utilização do *swab* vaginal. A eliminação urinária de *Brucella* é comumente relatada em cães machos (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1977; SERIKAWA et al., 1978, SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979), sendo que nas fêmeas seria observada especialmente durante o período de bacteremia. No caso, a eliminação urinária em fêmeas em ausência de bacteremia poderia estar associada à presença do agente em tecidos renais (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1990). Serikawa; Muraguchi e Nakao (1977) isolaram *B. canis* da medula e córtex renais em cães machos e fêmeas.

A PCR em amostras de *swab* vaginal parece constituir um método promissor para confirmação da infecção por *B. canis* em cães, em razão da alta sensibilidade apresentada pela técnica e da facilidade com que se realiza a extração e purificação de ácidos nucléicos deste tipo de material, por se tratarem de amostras com baixa quantidade de inibidores e de células do hospedeiro, quando comparadas às amostras de sangue. A presença de DNA de *Brucella* em amostras de *swab* vaginal detectada pela PCR, pode ainda ser um indicador de eliminação do agente no ambiente. Ressalta-se porém que neste caso a eliminação do agente não

necessariamente apresenta importância do ponto de vista de transmissão da infecção, já que, como discutido anteriormente, organismos não viáveis ou mesmo em pequeno número podem ser detectados pela PCR.

6.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR APLICADA EM AMOSTRAS DE SÊMEN

A avaliação da PCR em amostras de sêmen foi realizada comparando seu desempenho com o desempenho das provas de SAR, SAR-2ME, IDGA e cultivo microbiológico de sangue e sêmen. Em função do pequeno número de cães machos examinados, estes não foram divididos em grupos para o cálculo da sensibilidade e especificidade.

Proporções maiores de positivos foram observadas pela PCR em relação ao cultivo microbiológico nas amostras de sêmen (17 positivas pela PCR e 10 positivas pelo cultivo microbiológico). Todas as amostras positivas pelo cultivo foram positivas pela PCR, indicando ausência de inibidores da polimerização em sêmen canino.

A ocorrência de sete animais positivos pela PCR, porém negativos pelo cultivo microbiológico é esperada, em decorrência da maior sensibilidade da PCR. Destes, dois foram positivos pela hemocultura, sugerindo a eliminação de brucelas por via seminal em baixos níveis. Amin; Hamdy e Ibrahim (2001) também observaram uma maior proporção de positivos detectada pela PCR empregando *primers* específicos para *B. melitensis* (BRICKER; HALLING, 1994), em relação ao cultivo microbiológico em sêmen ovino e bovino. Neste caso, porém a PCR permitiu a detecção de DNA de *Brucella* apenas em amostras de fluido seminal livres de células. Em amostras de sêmen total ou contendo apenas células espermáticas houve inibição da reação de polimerização.

De acordo com Manterola. et al. (2003), o cultivo microbiológico de sêmen permitiu a detecção de um maior número de positivos do que a PCR, empregando os *primers* ISP1 e ISP2 (OUAHRANI-BETTACHE; SOUBRIER; LIAUTARD, 1996), em ovinos naturalmente e experimentalmente infectados. Neste caso, as amostras de sêmen foram colhidas diretamente do prepúcio após eletro-ejaculação, utilizando-se *swab* estéril.

As proporções de positivos detectadas pela PCR foram semelhantes às detectadas pela SAR e IDGA. Cães negativos sorologicamente, negativos pela hemocultura, porém positivos pela PCR em amostras de sêmen, possivelmente apresentavam-se cronicamente infectados, com persistência do agente em tecidos reprodutivos e declínio dos níveis de anticorpos séricos (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; MOORE; KAKUK, 1969; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; UEDA et al., 1974 a,b; YAMAGUCHI et al., 1974). Wooley et al. (1978) relataram isolamento de *B. canis* de testículos e próstata de um cão com ausência de bacteremia e não reagente a soroaglutinação rápida e a soroaglutinação lenta em tubos, o que caracteriza a infecção crônica.

Já cães que apresentaram-se em bacteremia, sorologicamente negativos, porém positivos pela PCR em sêmen, podem sugerir fase inicial da infecção, em que os títulos de anticorpos anti-*Brucella* apresentam-se em níveis baixos, mas o agente encontra-se disseminado pelo organismo, sendo inclusive eliminado pela via seminal.

As proporções de resultados positivos obtidos pelo cultivo microbiológico de amostras de sêmen foram estatisticamente semelhantes às obtidas pela SAR e IDGA, indicando a possibilidade de utilizar o cultivo microbiológico como método confirmatório da infecção. O sucesso no isolamento de *B. canis* a partir de amostras de sêmen depende do período da infecção em que o animal se encontra, já que a eliminação do agente por via seminal ocorre de maneira intermitente. Manterola et al. (2003) verificaram 4 de 14 ovinos

experimentalmente infectados positivos pelo cultivo microbiológico em amostras epidídimos e vesícula seminal, mas que não apresentaram excreção de brucelas por via seminal detectável pelo cultivo microbiológico ou PCR em sêmen. George; Duncan e Carmichael (1979) descreveram eliminação de brucelas em grande número pelo sêmen nas primeiras 12 semanas pós-infecção, quando os animais apresentavam-se ainda em bacteremia. Após este período, a taxa de eliminação bacteriana por via seminal é reduzida, o que coincide com o início da resposta inflamatória, provocando ativação de macrófagos e destruição bacteriana. Assim, o cultivo seminal parece não constituir um bom indicador de persistência bacteriana em tecidos reprodutivos após este período. Animais positivos pela PCR, porém negativos pelo cultivo microbiológico em sêmen podem apresentar-se numa fase mais tardia da infecção, quando ocorre eliminação de bactérias não viáveis ou em menor número.

As proporções de positivos detectadas pela PCR em sêmen e hemocultura foram semelhantes. Seis cães foram positivos pela PCR em sêmen, porém negativos pela hemocultura (destes, um foi positivo pela SAR e um positivo pela IDGA), o que sugere infecção crônica ou bacteremia intermitente, de acordo com o discutido anteriormente. Dois cães foram positivos pela hemocultura, mas negativos pela PCR, possivelmente por ausência de eliminação seminal de brucelas no momento da colheita. Gordon; Pue e Rutgers (1985) e Schoeb e Morton (1978) relataram isolamento de *B. canis* de epidídimos de um animal sorologicamente positivo, porém em ausência de bacteremia, resultado característico de infecção tardia.

Estes resultados indicam que a PCR constitui um método mais sensível do que o cultivo microbiológico para determinar a ocorrência ou não de eliminação seminal do agente.

6.7 AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESULTADO POSITIVO NOS TESTES LABORATORIAIS E PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS DE BRUCELOSE

A análise das associações entre a presença de pelo menos um sinal clínico sugestivo de brucelose e os resultados dos diferentes procedimentos laboratoriais empregados, revelou a existência de associação entre as proporções de positivos pelos testes de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, PCR em sangue e cultivo de *swab* vaginal e a presença de pelo menos um sinal clínico sugestivo de brucelose. o que confirma o poder do exame clínico para o estabelecimento da suspeita da infecção e está de acordo com os resultados obtidos por Hubbert; Bech-Nielsen e Barta (1980).

Já o cultivo microbiológico de sêmen e a PCR em amostras de sêmen e *swab* vaginal não apresentaram diferenças nas proporções de positivos entre os animais com presença e ausência de sinais clínicos.

Cinquenta e seis animais foram positivos por pelo menos um dos métodos de diagnóstico direto utilizados (cultivo microbiológico ou PCR em amostras de sangue ou sêmen ou *swab* vaginal), porém não apresentaram sinal clínico sugestivo de brucelose, sendo 14 deles negativos em todos os testes sorológicos empregados. Apesar disso, 54 dos 56 cães nestas condições eram provenientes de canis onde cães infectados foram detectados pelo cultivo microbiológico.

Flores-Castro e Segura (1976) descreveram a ocorrência de cães positivos pela SAL e hemocultura, mas com ausência de sinais clínicos de brucelose. Por outro lado, Hubbert; Bech-Nielsen e Barta (1980) não observaram resultados soropositivos pela SAR e SAR-2ME dentre os animais com ausência de sinais clínicos de brucelose. Porém, 27% (17/63) dos cães

com sinais clínicos reprodutivos e 17,9% (7/39) dos animais com sinais não reprodutivos sugestivos de brucelose foram soropositivos respectivamente pela SAR e SAR-2ME.

O estabelecimento do diagnóstico em populações confinadas geralmente não apresenta problemas, pois um grande número de indivíduos em diferentes fases da infecção comumente apresentam-se envolvidos. As dificuldades são maiores quando o diagnóstico é realizado em casos individuais, os quais muitas vezes não apresentam sinais clínicos, mas são positivos pela SAR, ou ao contrário, apresentam sinais clínicos, mas são negativos sorologicamente. Tendo em vista a gravidade de um diagnóstico positivo, métodos sorológicos, bacteriológicos de moleculares devem ser utilizados em associação, para minimizar as chances de erro.

A PCR apresenta, de maneira geral, maior sensibilidade no diagnóstico da brucelose quando comparada ao cultivo microbiológico. Apesar do maior custo para realização da PCR em comparação com o cultivo, a detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* em clínicas constitui uma alternativa interessante para a confirmação da infecção, principalmente em populações caninas confinadas, por permitir um diagnóstico rápido. A rapidez na identificação e eliminação dos cães positivos das populações confinadas reduz a disseminação da infecção e o acometimento de um grande número de animais.

7 CONCLUSÕES

1. Os resultados do presente trabalho apontam para a necessidade de associação entre testes laboratoriais diretos e indiretos com exame clínico e informações como procedência do animal e manejo dos animais/canis, para o estabelecimento do diagnóstico da brucelose.
2. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que a prova de SAR deve ser utilizada cautelosamente como prova de triagem, devido à ocorrência de resultados falsos-negativos. Animais não reagentes devem ser submetidos a hemocultura ou PCR em sangue e se permanecerem negativos, devem ser examinados novamente pela SAR após 30 a 60 dias.
3. A alta especificidade diagnóstica da SAR-2ME e IDGA credenciam estas técnicas para confirmação da infecção. Por outro lado, a baixa sensibilidade da SAR-2ME e IDGA indicam que estas provas não devem ser empregadas como provas de triagem nos casos individuais.
4. A prova de IDGA é útil como teste de triagem para a identificação de canis infectados, em que o exame é realizado em diversos animais. A ocorrência de um único animal soropositivo pela IDGA numa população confinada sugere a presença da infecção no plantel.

5. O cultivo de sêmen ou *swab* vaginal apresentou pequeno valor para o diagnóstico laboratorial da brucelose canina, em função das baixas taxas de isolamento do agente em animais infectados.
6. A PCR apresentou desempenho diagnóstico semelhante ao cultivo microbiológico. Os métodos moleculares de diagnóstico apresentam custo mais elevado em relação ao cultivo, porém permitem maior rapidez no diagnóstico da infecção.

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.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; RIESZ, V. S.; CRUZ, T. F.; LABRUNA, B. H.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. A. Anti-*Brucella abortus* and anti-*Brucella canis* antibodies occurrence in rural and urban dogs from Monte Negro county, Rondônia, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1216-1219, 2005.
- ALMEIDA, A. C., SANTORELLI, A., BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.
- AL-NAKKAS, A. F.; WRIGHT, S. G.; MUSTAFA, A. S.; WILSON, S.. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, p. 397-403, 2002.
- AL-NAKKAS, A.; MUSTAFA, A. S.; WRIGHT, S. G. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. **J. Medical Microbiology**. v. 54 Pt 8, p. 727-730, 2005.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1976. 109 p.
- ALVES, C. J.; ALVES, F. A. L. ; GOMES, A. A. B. ; AZEVEDO, S. S. ; ANDRADE, J. S. L.; SANTOS, F. A. . Aspectos Epidemiológicos de *Brucella canis* em Patos, Paraíba, Brasil. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 45-49, 2003.
- 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.
- ANDERSON, G. I.; BINNINGTON, C. Discospondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 24, p. 249-252, 1983.
- ARESE, A.; CRAVERO, S.; BOSCHIROLI, M.; CAMPOS, E.; SAMARTINO, L.; ROSSETTI, O. Uso de uma proteína recombinante de *Brucella abortus* para el diagnóstico de la brucelosis en diferentes especies animales. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 31, n. 1, p. 36-39, 1999.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4.ed. New York: Wiley & Sons, 1999. 1512 p.
- AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P. S.; PINHEIRO, S. R.; MASCOLLI, R.; ALVES, C. J. Comparação de três testes sorológicos

aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 106-112, 2004.

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 do Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p.156-160, 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, p. 271-275, 1992.

BALDI, P. C.; WANKE, M. M.; LOZA, M. E.; FOSSATI, C. A. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 41, n. 1-2, p. 127-134, 1994.

BALDI, P. C.; WANKE, M. M.; LOZA, M. E.; MONACHESI, N.; FOSSATI, C. A. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 2-3, p. 273-281, 1997.

BARG, L.; GODOY, A. M.; GRANDI, T. S. M. Pesquisa de aglutininas para *Brucella abortus* e *Brucella canis* em soros de escolares do Estado de Santa Catarina. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 30, n. 3, p. 311-315, 1978.

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

BLANKENSHIP, R. M.; SANFORD, J. P. *Brucella canis*. A cause of undulant fever. **American Journal of Medicine**, v. 59, n. 3, p. 424-426, 1975.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 2402, p. 1-12, 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, 1994.

BROWN, G. M.; RANGER, C. R.; KELLEY, D. J. Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. **Cornell Veterinarian**, v. 61, n. 2, p. 265-280, 1971.

CAMPERO, C.M., LADDS, P.W., HOFFMANN, D., DUFFIELD, B., WATSON, D. AND FORDYCE, G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection in the genitalia of bulls. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.24, p.235-246, 1990.

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

CARMICHAEL, L. E. and 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. *Brucella canis* In: NIELSEN, K., DUNCAN, J.R. (Ed.), **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. pp. 335-350.

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

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

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

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

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C.; JONES, L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 373-387, 1989.

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

CARMICHAEL, L. E.; ZOHA, S. J.; FLORES-CASTRO, R. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. **Development in Biological Standardization**, v. 56, p. 649-656, 1984.

CARMICHAEL, L. E: Brucellosis (*Brucella canis*): In STEELE, J.H. (Ed.): **CRC Handbook Series in Zoonoses**, v. 1. Florida:Boca Raton: CRC Press, 1979. pp.185-194.

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.; 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.

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 and Infectious Diseases**, v. 20, p.127-31, 2001.

CASSATARO, J.; PASQUEVICH, K.; BRUNO, L.; WALLACH, J. C.; FOSSATI, C. A., BALDI, P. C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucella*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 111-114, 2004.

ÇETINKAYA, B.; ONGOR, H.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; KALENDER, H.; ERDOGAN, H. M. Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. **Veterinary Record**, v. 144, n. 9, p. 239-240, 1999.

CICUTA, M. E.; MIRANDA, A. O. Primer aislamiento de *Brucella canis* en la ciudad de corrientes, Argentina. **Veterinaria Argentina**, v. 7, n. 67, p. 463-465, 1990.

CLOECKAERT, A.; BAUCHERON, S.; VIZCAINO, N.; ZYGMUNT, M. S. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 772-775, 2001.

COGSWELL, F. B.; BANTAR, C. E.; HUGHES, T. G. U, Y.; PHILIPP, M. T. Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 980-982, 1996.

COLMENERO, J. D.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; MARIA REGUERA, J.; ANGEL SUAREZ-MUNOZ, M.; MARTIN-CARBALLINO, S.; MORATA, P. Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, p.159-167, 2002.

CÔRTEZ, 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 foetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

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.

DAHOUK, S. A. L; 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.

DAWKINS, B. G.; MACHOTKA, S. V.; SUCHMANN, D.; MCLAUGHLIN, R. M. Pyogranulomatous dermatitis associated with *Brucella canis* infection in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 11, p.1432-1433, 1982.

DILLON, A. R.; HENDERSON, R. A. *Brucella canis* in a uterine stump abscess in a bitch. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 9, p. 987-988, 1981.

DZIEZYC, J. Canine systemic bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1103-1117, 2000.

ELFAKI, M. G.; AL-HOKAIL, A.; NAKEEB, S. M.; AL-RABIAH, F. A.. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. **Medical Science Monitor**, v. 27, p. MT69-74, 2005a.

ELFAKI, M. G.; UZ-ZAMAN, T.; AL-HOKAIL, A. A.; NAKEEB, S. M. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p.1-7, 2005b.

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.

FERREIRA, T.; FIGUEIREDO, M. J.; RONCONI, M. A.; TORRES, H. M.; AQUINO, M. H. C.; GOMES, M. J. P.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, L. A. T .O. Brucelose canina: obtenção de antígenos e avaliação pela técnica de imunodifusão em gel de agarose. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 10, n. 3, p. 156-160, 2003.

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

FLORES-CASTRO, R.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. **Cornell Veterinarian**. v. 68, p.76-88, 1978. Supplement 7.

FORBES, L. B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 911-916, 1990.

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.

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, p. 512-514, 1998.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 35, n. 7, p. 905-909, 1974.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. **Cornell Veterinarian** v. 8, n. 4, p. 530-543, 1978.

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

GEORGE, L.W; CARMICHAEL, L. E. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. **American Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 2, p. 274-81, 1984.

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.; 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.

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

GOMES, 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. **Clinica Veterinaria**, v.4, n.18, p.17-20, 1999.

GONZÁLEZ, H. B.; RAMÍREZ, R. M. P.; CASTRO, R. F.; GÜEMES, F. S. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. **Veterinaria Mexico**, v. 35, n. 2, p.121-128, 2004.

GORDON, J. C.; PUE, H. L.; RUTGERS, H. C. Canine brucellosis in a household. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 86, n. 7, p. 695-698, 1985.

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

GWIN, R. M.; KOLWALSKI, J. J.; WYMAN, M. Ocular lesions associated with *Brucella canis* infection in a dog. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 16, p. 607-610, 1980.

HAMDY, M. .; 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.

HARTIGAN, P. J. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. **Irish Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 179-180, 1997.

HENDERSON, R. A.; HOERLEIN, B. F.; KRAMER, T. T.; MEYER, M. E. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 5, p. 451-455, 1974.

HUBBERT, N. L.; BECH-NIELSEN, S.; BARTA, O. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 2, p. 168-171, 1980.

HUROV, L.; TROY, G.; TURNWALD, G. Diskospondylitis in the dog: 27 cases. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 3, p. 275-281, 1978.

IRIBARREN, F.; BREGLIA, J.; CASTILHO, M.; ESCOBAR, V.; HOFFMAN, F. Comparación de las pruebas de inmunodifusión del gel de agar con antígeno de *Brucella ovis* y aglutinación en placa con *Brucella canis* M(-) para el diagnóstico de la brucelosis canina. **Veterinaria Argentina**, v.16, n.52, p.146-150, 1999.

JENNINGS, P. B.; CRUMRINE, M. H.; LEWIS, G. E.; FARISS, B.L. The effect of a two-stage antibiotic regimen on dogs infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 164, n. 5, p. 513-514, 1974.

JOHNSON, C. A.; BENNETT, M.; JENSEN, R. K.; SCHIRMER, R. Effect of combined antibiotic therapy on fertility in brood bitches infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 11, p. 1330-1333, 1982.

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

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

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

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.; SOARES, R. M.; CHIEBAO, D. P.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Brucelose em canis comerciais do município de São Paulo. **Arquivos Instituto Biológico de São Paulo**, v.71, p.534-536, 2004b. Suplemento.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; MORAIS, Z. M. RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p.161-166, 2004a.

KERWIN, S. C.; LEWIS, D. D.; HRIBERNIK, T. N.; PARTINGTON, B.; HOSGOOD G.; EILTS, B.E. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases(1980-1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 8, p. 1253-1257, 1992.

KORNEGAY, J. N.; BARBER, D. L. B. Diskospondylitis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 4, p.337-341, 1980.

KRAKOWKA, S. Transplacentally acquired microbial and parasitic diseases of dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 1, p. 750-753, 1977.

LARSSON, M. H. M. A. Pesquisa de aglutininas anti *Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 404-407, 1980.

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.

LARSSON, M. H. M. A.; COSTA, E. O. C.; LARSSON, C. E.; GUERRA, J. L. Brucelose canina experimental: estudos bacteriológico, sorológico e anatomopatológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 2, p.141-156, 1984.

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, n.12, p. 3087-3090, 1995.

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.

LEWIS, G. E.; CRUMRINE, M. H.; JENNINGNS, P. .; FARISS, B. L. Therapeutic value of tetracycline and ampicillin in dogs infected with *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 3, p. 239-241, 1973.

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

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

LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; JACOB, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, Pt. 5, p. 457-461, 2005a.

LUCERO, N. E.; JACOB, N. O.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; TUCCILLO, P.; JACQUES, I. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, Pt. 5, p. 505-508, 2005b.

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, 9, 1992, Gramado. **Anais...**Gramado, 1992. p.92.

MAIA, G.R, ROSSI, C.R.S.; ABRADIA, F. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói-RJ. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 425-427, 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.

MARASSI, C. D.; MORAES, I. A.; LILENBAUM, W. Comparação entre antígenos de *B.canis* e de *B.ovis* para o diagnóstico da Brucelose Canina em testes de Imunodifusão em Gel-Agarose. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 103-107, 2004.

MARASSI, C. D.; MORAES, I. A.; LILENBAUM, W. Soroprevalência de brucelose canina no Município do Rio de Janeiro-RJ pelo método de imunodifusão em gel agarose. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n.1, p. 63-4, 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. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 1, p.1-10, 1995.

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.

MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTIN, M.; SOLER, M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 54, n.7, p.1043-1046, 1993.

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

MEGID, J.; MORAES, C. C. G. M.; MARCOS JR., G.; AGOTTANI, J. V. B. Perfil sorológico, isolamento bacteriano e valores hematológicos e urinários em cães naturalmente infectados com *Brucella canis*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 3, p. 405-409, 2000.

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.

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

MOORE, J. A.; BENNETT, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion. **Veterinary Record**, v. 80, n. 20, p. 604-605, 1967.

MOORE, J. A.; GUPTA, B. N. Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 156, n.12, p.1737-1740, 1970.

MOORE, J. A.; GUPTA, B. N.; CONNER, G. H. Eradication of *Brucella canis* infection from a dog colony. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 5, p. 523-527, 1968.

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.

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

MORAES, I. A.; LARANJA, H. F.; VIEIRA, D. K.; LOPES, S. P.; FREAZA, A.; MELO, G.; PENCHEL, V. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da Cidade do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, p. 154-157, 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.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; REGUERA, J. M.; GARCIA-ORDONEZ, M. A.; PICHARDO, C.; COLMENERO, J. D. Posttreatment follow-Up of brucellosis by PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4163-4166, 1999.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; REGUERA, J. M.; MIRALLES, F.; LOPEZ-GONZALEZ, J. J.; COLMENERO, J. D. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3743-3746; 2001.

MORRISET, R; SPINK, W. W. Epidemic canine brucellosis due to a new species, *Brucella canis*. **Lancet**, v. 2, p.1000-1002, 1969.

MORSE, E.V.; RISTIC, M.; WITT, L.E.; WIPF, L. Canine abortion apparently due to *Brucella abortus*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 122, n.910, p.18-20. 1953.

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 American Medical Association**, v. 231, n. 12, p. 1267-1269, 1975.

MYERS, D. M.; JONES, L. M.; VARELA-DIAZ, V. M. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 894-902, 1972.

MYERS, D. M.; VARELA-DIAZ, V. M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. **Cornell Veterinarian**, v. 70, n. 3, p. 258-265, 1980.

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. **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. 1435, p.1-5, 2002.

NAVARRO, E.; CASÃO, M.A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. **Expert Review Molecular Diagnosis**, v.4, n.1, p. 115-23. 2004

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.

NICOLETTI, P. Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 6, p. 944-947, 1991.

NICOLETTI, P.L.; CHASE, A. The use of antibiotics to control canine brucellosis. **Compendium on Continuing Education Pract. Vet.**, v. 9, p. 1063-1066, 1987.

NIMRI, L.F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, v. 28, p.1-7,2003.

OUAHRANI-BETTACHE, S.; SOUBRIER, M.P.; LIAUTARD, J.P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 2, p.154-160,1996.

PETRIE, A.; WATSON, P. **Statistics for veterinary and animal science**. Oxford, Malden: Blackwell Science, 1999. 243 p.

PICKERILL, P. A. and CARMICHAEL, L. E. Canine Brucellosis: Control Programs in Commercial Kennels and Effect on Reproduction. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.15, p.1607-1615, 1972.

PICKERILL, P.A. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. **J Journal of American Veterinary Medical Association**, v.156, n.12, p.1741-1742, 1970.

PILLAI, M. T.; NEDUNCHELLIYAN, 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.

POLT, S. S.; DISMUKES, W. E.; FLINT, A.; SCHAEFER, J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, n. 5, p.717-719, 1982.

PRIOR, M. G. Isolation of *Brucella abortus* from two dogs in contact with bovine brucellosis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 40, n. 1, p.117-118, 1976.

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.

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; GARCIA-ORDONEZ, M. A.; COLMENERO, J. D.; MORATA, P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. **Biotechniques**, v. 27, p. 248-250, 252, 1999.

RHOADES, H. E.; MESFIN, G. M. *Brucella canis* infection in a kennel. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 75, n. 4, p. 595-599, 1980.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

RIECKE, J. A.; RHOADES, H. E. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. **Journal of the 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 Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1683-1688, 1996.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. By PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 5, p. 3735-3737, 1999.

ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, M. J.; DIAZ, R.; BLASCO, J. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, 1995.

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 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.

SAAH, A. J.; HOOVER, D. R. "Sensitivity" and "Specificity" reconsidered. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, p. 91-94, 1997.

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. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 39 n. 2, 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.

SCHOEB, T. R.; MORTON, R. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 5, p. 598-600, 1978.

SERIKAWA, T.; KONDO, Y.; TAKADA, H.; YAMADA, J. Head-to-head type auto-sperm agglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 46, n. 1, p. 41-48, 1984.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N. A survey of dogs from Gifu and Shiga area for *Brucella canis*. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 39, n. 6, p. 635-642, 1977.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; NAKAO, N.; IRIE, Y. Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 40, n. 3, p. 353-355; 1978.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; YAMADA, J.; TAKADA, H. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. **Jikken Dobutsu**, v. 30, n.1, p.7-14, 1981a.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T.; YAMADA, J.; TAKADA, H. Spermagglutination and spermagglutinating activity of serum and tissue extracts from reproductive organs in male dogs experimentally infected with *Brucella canis*. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 43, n. 4, p. 469-490, 1981.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 41, n. 6, p. 607-616, 1979.

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.

SMEAK, D. D.; OLMSTEAD, M. L.; HOHN, R. B. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 8, p. 986-990, 1987.

SOUZA, L.A.; VIANA, R.C.A.; MICHALICK, M.S.M.; REIS, J.K.P.; LAGE, A.P. Prevalência da infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte–MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 127-131, 2002.

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

SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F.; PERUMAALLA, V. S.; FICHT, T. A.; ADAMS, L. G.; HAGIUS, S. D.; ELZER, P. H.; BRICKER, B. J.; KUMAR, G. K.; RAJASEKHAR, M.; ISLOOR, S.; BARATHUR, R. R. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2602-2610, 2000.

SWENSON, R. M.; CARMICHAEL, L. E.; CUNDY, K. R. Human infection with *Brucella canis*. **Annals of Internal Medicine**, v. 76, n. 3, p. 435-438, 1972.

TANTILLO, G. M.; DI PINTO, A.; BUONAVOGLIA, C. Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research** v. 70, p. 245-247, 2003.

TANTILLO, G. M.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of Food Protection**. v. 64, p.164-167, 2001.

TAYLOR, D. J.; RENTON, J. P.; MCGREGOR, A. B. *Brucella abortus* biotype 1 as a cause of abortion in a bitch. **Veterinary Record**, v. 96, p. 428-429, 1975.

TERAKADO, N.; UEDA, H.; SUGAWARA, H.; ISAYAMA, Y.; KOYAMA, N. Drug susceptibility of *Brucella canis* isolated from dogs. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 40, n. 3, p. 291-295, 1978.

THOMAS, W. B. Diskospondylitis and other vertebral infections. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 30, n. 1, p.169-182, 2000.

UEDA, K.; MAGARIBUCHI, T.; SAEGUSA, J.; URANO, T.; ITO, K. Spontaneous *Brucella canis* infection in beagles: bacteriological and serological studies. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 36, n. 5, p.381-389, 1974a.

UEDA, K.; SAEGUSA, J.; FUJIWARA, K.; MUTO, S.; OKADA, K. Detection of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 36, n. 6, p. 539-542, 1974b.

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.; ROMERO C.; LOPEZ-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. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 759-68, 1998.

VIEIRA, D. K.; MORAES, I. A.; ROSSI, C. R.S.; RAMOS, M. L. M.; BARRETO, L. S. . Identificação de cães reagentes à *Brucella canis* nos ambientes rural e urbano no Estado do Rio De Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p.123, 2000. Suplemento.

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.** 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VON BEROLDINGEN, C. H.; BLAKE, E. T.; HIGUCHI, R.; SENSABAUGH, G. F.; ERLICH, H.A. Application of PCR to the analysis of biological evidence. In: ERLICH, H.A. (Ed.). **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**. New York: Stockton Press, 1990, p. 209–223.

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.

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

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 367-375, 2002.

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

YAMAUCHI, C.; SUZUKI, T.; NOMURA, T.; KUKITA, Y.; IWAKI, T.; KAZUNO, Y.; GHODA, A. Canine brucellosis in a Beagle breeding colony. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, p. 539, 1974.

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

ZAMORA, J.; ALONSO, O.; MARTIN, R. Canine brucellosis in Valdivia, Chile. Serological and bacteriological studies of town dogs. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 27, n. 2, p.149-153, 1980.

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. J.; CARMICHAEL, L. E. Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidiness. **Cornell Veterinarian**, v. 71, n. 4, p. 428-438. 1981.

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

ZYGMUNT, M.S.; BAUCHERON, S.; VIZCAINO, N.; BOWDEN, R.A.; CLOECKAERT, A. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Vet. Microbiol.** v.87, n.3, p.213-220, 2002.

ANEXO

Tabela 14 – Resultado do exame clínico, soroglutinação rápida com e sem 2-mercaptoetanol, imunodifusão em gel de ágar, cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo em cães naturalmente infectados, São Paulo – 2006

Animal	Sexo	Cultivo sangue	Cultivo trato reprodutivo	SAR	SAR-2ME	IDGA	PCR sangue	PCR trato reprodutivo	Sinal clínico	Canil infectado
606	Macho	-	-	positivo	-	-	positivo	-	-	positivo
608	Macho	-	-	positivo	-	-	-	-	-	positivo
770	Macho	-	-	positivo	-	NR	positivo	-	positivo	-
840	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
841	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
846	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
853	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
866	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
873	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
874	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
935	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
936	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
937	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	-
938	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
939	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
940	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
941	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
942	Fêmea	-	-	positivo	-	NR	-	-	-	-
943	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
944	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
945	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	-
946	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
947	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	-
948	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
966	Fêmea	-	-	positivo	-	positivo	-	-	-	-
971	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
977	Fêmea	-	-	positivo	-	-	positivo	-	-	-
993	Fêmea	-	-	positivo	-	NR	-	-	positivo	-
994	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	-
1040	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1041	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1043	Macho	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1044	Macho	-	-	positivo	-	-	positivo	-	-	-
1046	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1047	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1048	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1049	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1050	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1051	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1100	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	positivo	positivo
1103	Fêmea	-	-	positivo	positivo	positivo	positivo	-	positivo	positivo
1112	Macho	-	-	-	-	positivo	-	-	-	positivo
1115	Macho	-	-	-	-	NR	-	positivo	-	positivo
1135	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	positivo	positivo
1137	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	-	positivo
1145	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	-	positivo
1191	Fêmea	-	-	positivo	-	positivo	positivo	-	-	positivo
1210	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-

Tabela 14 - Resultado do exame clínico, soroglutinação rápida com e sem 2-mercaptoetanol, imunodifusão em gel de ágar, cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo em cães naturalmente infectados, São Paulo – 2006

Continuação

Animal	Sexo	Cultivo sangue	Cultivo trato reprodutivo	SAR	SAR-2ME	IDGA	PCR sangue	PCR trato reprodutivo	Sinal clínico	Canil infectado
1213	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1214	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	positivo	-
1215	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1216	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1217	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
1218	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	-	-	-
1219	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	-	positivo
1220	Fêmea	-	-	positivo	-	-	-	positivo	-	positivo
1397	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1398	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1399	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1404	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1407	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1413	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1416	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1428	Macho	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1429	Macho	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1431	Macho	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1433	Macho	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1466	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1467	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1468	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1471	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1474	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1475	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1476	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1477	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1478	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1485	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1486	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1487	Fêmea	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo	positivo
1488	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1489	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1490	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1492	Macho	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1493	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	positivo	positivo
1494	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1495	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1496	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1497	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1498	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1503	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	positivo	positivo
1504	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1505	Fêmea	-	-	-	-	-	positivo	-	-	positivo
1508	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1509	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1511	Macho	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
1516	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1517	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo

Tabela 14 –Resultado do exame clínico, soroglutinação rápida com e sem 2-mercaptoetanol, imunodifusão em gel de ágar, cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo em cães naturalmente infectados, São Paulo – 2006

Continuação

Animal	Sexo	Cultivo sangue	Cultivo trato reprodutivo	SAR	SAR-2ME	IDGA	PCR sangue	PCR trato reprodutivo	Sinal clínico	Canil infectado
1526	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1527	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1529	Macho	-	-	-	-	NR	-	positivo	-	positivo
1530	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1531	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
1532	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	positivo	positivo
1533	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1538	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	-	positivo
1539	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1541	Macho	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
1543	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	-
1544	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1545	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1546	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1547	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1548	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1550	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1551	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1552	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1553	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1554	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1555	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	Macho	-	-	-	-	positivo	-	positivo	positivo	positivo
1558	Macho	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1565	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1567	Macho	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1573	Fêmea	-	-	-	-	NR	-	-	positivo	positivo
1574	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1576	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1577	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	positivo	positivo
1578	Fêmea	-	-	-	-	-	-	-	-	positivo
1581	Fêmea	-	-	-	-	-	-	positivo	-	positivo
931	Macho	-	-	-	-	-	-	-	positivo	-
733	Macho	-	positivo	positivo	-	NR	positivo	positivo	positivo	positivo
813	Macho	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	-	-	positivo
844	Fêmea	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	positivo	-	positivo
854	Fêmea	positivo	-	positivo	-	-	positivo	positivo	-	positivo
856	Fêmea	positivo	-	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	-	positivo
860	Fêmea	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	positivo	-	positivo
863	Fêmea	positivo	-	positivo	-	-	-	positivo	positivo	positivo
957	Fêmea	positivo	-	positivo	-	NR	positivo	-	-	positivo
960	Fêmea	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	-	-	positivo
1026	Fêmea	positivo	-	positivo	positivo	positivo	-	positivo	-	positivo
1098	Fêmea	positivo	-	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
1101	Fêmea	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
1102	Fêmea	positivo	-	positivo	positivo	positivo	positivo	-	positivo	positivo
1104	Fêmea	positivo	-	positivo	-	positivo	positivo	-	positivo	positivo

Tabela 14 – Resultado do exame clínico, soroaglutinação rápida com e sem 2-mercaptoetanol, imunodifusão em gel de ágar, cultivo microbiológico e PCR em amostras de sangue e trato reprodutivo em cães naturalmente infectados, São Paulo – 2006

Conclusão

Animal	Sexo	Cultivo sangue	Cultivo trato reprodutivo	SAR	SAR-2ME	IDGA	PCR sangue	PCR trato reprodutivo	Sinal clínico	Canil infectado
1147	Macho	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	-	positivo
1148	Macho	positivo	positivo	-	-	NR	positivo	positivo	-	positivo
1149	Macho	positivo	positivo	positivo	-	positivo	positivo	positivo	-	positivo
1432	Macho	positivo	positivo	positivo	-	NR	positivo	positivo	-	positivo
1438	Macho	positivo	positivo	positivo	-	NR	positivo	positivo	-	positivo
1524	Fêmea	positivo	positivo	positivo	-	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
1540	Macho	positivo	positivo	-	-	positivo	-	positivo	positivo	positivo
1559	Fêmea	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

SAR: Prova de soroaglutinação rápida

SAR-2ME: Prova de soroaglutinação rápida com emprego do 2-mercaptoetanol

IDGA: prova de imunodifusão em gel de ágar

NR: Não realizado

(-): Resultado negativo

Canil infectado: canil em que foi realizado isolamento de *Brucella canis* de pelo menos um animal