we
MARIA HELENA MATIKO AKAO LARSSON

Dr 83

Ø

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA BRUCELOSE CANINA

Tese apresentada ao
Departamento de Epidemiologia
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: PROF. DR. RUY LAURENTI

SÃO PAULO
1979

BIBLIOTECA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CP. 0

Aos meus pais
e irmão.

Ao Carlos Eduardo
e
Carlão.

AGRADECIMENTOS.

- Ao Prof.Dr. Ruy Laurenti, pela acolhida, amizade e orientação que sempre nos ofereceu.
- Ao Prof.Dr. Leland E. Carmichael e ao Dr. Richard Pohl, pelo fornecimento, respectivamente, da amostra padrão utilizada nas reações de soroaglutinação lenta e dos "kits" utilizados para execução das reações de soroaglutinação rápida.
- À Profa.Dra. Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães, pela orientação e auxílio no isolamento e identificação das amostras.
- À Profa.Dra. Mitika K. Hagiwara, pelo estímulo, colaboração e sugestões apresentadas.
- Aos Professores Dr. Eduardo Harry Birgel e Dr. Gil Vianna Paim, pela leitura cuidadosa do texto e valiosas sugestões.
- À Profa.Dra. Masaio Mizuno Ishizuka, pela orientação e auxílio na tabulação e análise estatística dos resultados obtidos.
- Ao Prof.Dr. Omar Miguel, pela colaboração na análise estatística dos resultados.
- Ao Prof.Dr. Paulo Hideki Yassuda, pela cessão dos soros de cães errantes.
- Ao Dr. Agnaldo Gonçalves, na qualidade de Diretor do Centro de Saúde "Geraldo de Paula Souza", da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela cessão dos soros humanos.
- À Sra. Regina Mieko Sakata Mirandola, pelo desmedido auxílio na execução técnica deste trabalho.
- Ao Sr. Nilson Eugênio Costa e ao acadêmico Moacir Kazuto Oizumi, pela colaboração prestada na coleta do material.

Ao Serviço Médico Cirúrgico e Hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas facilidades na obtenção e manutenção dos animais inoculados.

Às bibliotecárias Ana Maria Silveira Barone e Daisy Pires Noronha, bem como à Srta. Maria Inês Chareli, pela colaboração na obtenção, revisão e ordenação das referências bibliográficas.

Ao Sr. Sussumu Hagiwara, pelas ilustrações.

Aos colegas Gilberto De Grutolla e Plínio Rocha Campos, aos criadores Emerick Toaren e José Roberto Paiva e aos funcionários Altiva Lima Rodrigues e Francisco Vieira de Camargo, pela colaboração na realização deste trabalho.

R E S U M O.

O presente trabalho foi realizado visando o estudo da prevalência da infecção por Brucella canis em cães, através da pesquisa de anticorpos específicos, em dois grupos distintos de animais (de canil e errantes). Para tanto, foram utilizadas as provas de soroaglutinação rápida (SAR) e soroaglutinação lenta (SAL). Nos animais soropositivos procurou-se, através de hemocultura, isolar o agente etiológico. Com o intuito de estudar a imunoresposta humoral e o período de bacteremia determinados por esse agente infeccioso, oito cães foram inoculados, por via oral, com uma amostra autóctone de Brucella canis (ES 11/78). Finalmente, para avaliar o risco da infecção humana por Brucella canis, examinaram-se trezentos e trinta soros humanos através da prova de SAL.

A prevalência da infecção nos animais de canil, segundo a prova de SAR, foi de 9,1%, enquanto que se obteve 2,4% de reagentes pela prova de SAL. Em relação aos animais errantes, observou-se 7,5% de reagentes pela prova de SAR e 7,0% pela prova de SAL.

De seis animais reagentes examinados foram isoladas três amostras de Brucella canis: a amostra ES 11/78, de um animal de canil, e as amostras 215/79 e Pr/79, de cães errantes. As referidas amostras foram identificadas através das características morfológicas, tintoriais e bioquímicas e, sorologicamente, utilizando antígenos produzidos com as mesmas.

Os animais inoculados experimentalmente, apresentaram aglutininas anti Brucella canis detectáveis, pela primeira vez, entre o 15º e 35º dias após a inoculação, segundo a prova de SAL, enquanto que a hemocultura foi positiva, pela primeira vez, 21 a 49 dias após a exposição dos cães ao agente infectante.

A prevalência da infecção humana por Brucella canis foi de 1,21%.

S U M M A R Y.

The prevalency of canine brucellosis was determined in two distinct groups of animals, one from kennel dogs and the other one from stray dogs, through the detection of specific serum antibodies based on the results of tube agglutination test (TAT) and plate agglutination test (PAT). Attempts were made for the isolation of the infectious agent by means of blood culture of the seropositive animals. In order to study the humoral immune response and the period of bacteremia elicited by agent, eight dogs were experimentally infected, by oral route, with an autochthon strain of Brucella canis (ES 11/78), isolated from one kennel dog. The evaluation of human infection with Brucella canis was performed testing 330 serum samples.

The prevalence of the infection in the kennel dogs was 9.1% by plate PAT test and 2.4% by tube TAT test, while, in the stray dogs group, it was observed 7.5% of reagents by TAT and 7.0% of reagents by PAT.

Three samples of Brucella canis were isolated from the seropositive dogs: the strain ES 11/78, from a kennel dog, and strains 215/79 and Pr/79 from stray dogs. The samples were identified through the morphological, staining and biochemical characteristics of the agent as well as serologically, using antigens prepared with the isolated samples.

The experimentally infected dogs showed serum agglutinins against Brucella canis, by the first time, between the 15th and 35th days after inoculation, while the blood culture was positive, firstly, 21 to 49 days after the exposition of the dogs to the infectious agent.

The prevalence of human infection with Brucella canis was 1.21%.

Í N D I C E

	pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. LITERATURA.....	7
2.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de soroaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.....	7
2.2. Isolamento de <u>Brucella canis</u>	8
2.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.....	10
2.4. Infecção por <u>Brucella canis</u> em humanos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de soroaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.....	12
3.2. Isolamento de <u>Brucella canis</u>	15
3.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.....	16
3.4. Infecção por <u>Brucella canis</u> em humanos.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de soroaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.....	18
4.2. Isolamento de <u>Brucella canis</u>	23
4.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.....	25
4.4. Infecção por <u>Brucella canis</u> em humanos.....	38
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 . INTRODUÇÃO .

1. INTRODUÇÃO.

Brucella canis, agente de aborto canino, foi primeiramente isolado em 1966 (CARMICHAEL ¹¹, 1967) e os primeiros trabalhos referentes à nova espécie de Brucella citam sua ocorrência epizootica, principalmente em cães da raça Beagle (BROWN e col., ⁷ 1976). Os cães também podem ser acometidos por outras espécies de Brucella, como: Brucella abortus, Brucella suis ou Brucella melitensis. Tais infecções são de ocorrência esporádica e geralmente resultam do contacto de cães de zona rural com produtos de origem animal contaminados ou da ingestão de restos de aborto de origem brucélica (NICHOLETTI e col., ⁵⁰ 1967; CLEGG ¹⁷, 1968; PHILIPPON e col., ⁵³ 1969; ROBERTSON ⁵⁷, 1973).

A brucelose canina é uma doença contagiosa de cães que se caracteriza por aborto, infertilidade, comprometimento de tecidos linfóides (MOORE ⁴⁴, 1969; SYMPOSIUM ON IMMUNITY... ⁶⁷, 1970; SPINK ⁶⁴, 1970; SPINK & MORISSET ⁶⁵, 1970; MEYER ⁴³, 1974) e bacteremia prolongada (SPINK ⁶⁴, 1970; VAN HOOSIER JR. e col., ⁷² 1970; CARMICHAEL & GEORGE ¹³, 1976).

Ao que tudo indica, o único animal em que a infecção ocorre naturalmente é o cão (MOORE ⁴⁴, 1969; MOORE & GUPTA ⁴⁶, 1970). Suínos, bovinos e ovinos são resistentes à infecção, por via oral, com Brucella canis, enquanto que os felinos podem ser infectados com o agente do aborto canino, por via oral (PICKERILL ⁵⁴, 1970). Dentre os animais de laboratório, os camundongos, cobaias e coelhos são sensíveis à infecção por Brucella canis (MOORE ⁴⁴, 1969; MOORE & GUPTA ⁴⁶, 1970).

A infecção acomete cães de todas as raças indistintamente (MOORE ⁴⁴, 1969; LEWIS JR. ³⁷, 1972; CARMICHAEL ⁹, 1976) e a sua transmissão se dá por contacto com tecidos excretados ou com corrimento vaginal de fêmea que abortou recentemente, contacto com urina de animais infectados e acasalamento de macho infectado com fêmea suscetível (MOORE ⁴⁴, 1969; ROBERTSON ⁵⁷, 1973; CAR

MICHAEL & GEORGE ¹³, 1976). Cães recém-nascidos bacterêmicos indicam a possibilidade de transmissão transplacentária (VAN HOO SIER JR. e col. ⁷², 1970).

A evidenciação clínica da brucelose canina tem sido descrita por vários autores (KIMBERLING e col. ³⁶, 1966; TAUL e col. ⁶⁸, 1967; MOORE ⁴⁴, 1969; MOORE & KAKUK ⁴⁷, 1969; CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴, 1970; HILL e col. ³², 1970; SPINK & MORISSET ⁶⁵, 1970). O principal sinal é o aborto, que ocorre geralmente no decorrer do terço final da gestação (48º ao 52º dia) e é seguido de corrimento vaginal mais ou menos prolongado. Nos machos, os sinais consistentes da infecção são: epididimite, prostatite, dermatite e/ou edema escrotal e, ocasionalmente, atrofia testicular, uni ou bilateral. Machos infectados manifestam-se relutantes ao acasalamento. Em ambos os sexos pode-se observar linfadenopatia, hêpato e esplenomegalias.

Os achados patológicos da infecção por Brucella canis incluem uma hiperplasia marcante do tecido linfóide de todo o organismo com proliferação de linfócitos, plasmócitos e células reticulares. Em machos, observam-se alterações da próstata, epidídimo e, ocasionalmente, de testículo (MOORE & KAKUK ⁴⁷, 1969; CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴, 1970; GLEISER e col. ²⁶, 1971; CARMICHAEL & GEORGE ¹³, 1976); em fêmeas, as únicas lesões significativas são os nódulos de células reticulares no endométrio (SPINK & MORISSET ⁶⁵, 1970). Achados patológicos mais recentes incluem meningoencefalite difusa (HARRIS e col. ²⁹, 1974), espondilite (HENDERSON e col. ³¹, 1974) e uveíte recorrente (RIECKE & RHOADES ⁵⁶, 1975; SAEGUSA e col. ⁵⁸, 1977).

A ausência de pirexia em animais infectados e a natureza insidiosa da doença em fêmeas não prenhes dificultam o diagnóstico clínico do processo; entretanto, pode-se suspeitar de brucelose canina quando surgem abortos, nascidos-mortos, epididimite ou atrofia testicular em machos sadios, insucessos repetidos nos acasalamentos e linfadenopatia (MOORE & GUPTA ⁴⁶, 1970; CARMICHAEL ⁹, 1976).

Os métodos sorológicos para diagnóstico da brucelose canina compreendem a aglutinação lenta em tubo (CARMICHAEL¹⁰, 1969; MOORE & KAKUK⁴⁷, 1969; SPINK & MORISSET⁶⁵, 1970; PICKERILL & CARMICHAEL⁵⁵, 1972), aglutinação rápida em placa (DAMP e col.,¹⁸ 1973; GEORGE & CARMICHAEL²⁴, 1974; BROWN e col.,⁸ 1976; GEORGE & CARMICHAEL²⁵, 1978), fixação de complemento (PICKERILL⁵⁴, 1970; PICKERILL, 1970, e DEYOE, 1970, citados por CARMICHAEL⁹, 1976), ágar gel-difusão (MYERS e col.,⁴⁹ 1974; WEBER & KRAUSS⁷⁹, 1975) e imunofluorescência indireta (WEBER & HUSSEIN⁷⁸, 1976); entretanto, o diagnóstico definitivo deve ser baseado no isolamento do agente a partir de sangue (MOORE⁴⁴, 1969; SPINK & MORISSET⁶⁵, 1970; SYMPOSIUM ON IMMUNITY ...⁶⁷, 1970; PICKERILL & CARMICHAEL⁵⁵, 1972), linfonodo ou medula óssea (CARMICHAEL⁹, 1976).

Vários antibióticos têm sido utilizados no tratamento de animais infectados; porém, a bacteremia desaparece apenas durante o tratamento, reaparecendo após o término do mesmo (MOORE⁴⁴, 1969; LEWIS JR e col.,³⁹ 1973). JENNINGS e col.³⁵ (1974) obtiveram sucesso limitado no tratamento de animais infectados utilizando combinações triplas de antibióticos, em doses elevadas e por longos períodos. TERAOKA e col.⁶⁹ (1978) verificaram uma grande suscetibilidade da Brucella canis à tetraciclina e aos antibióticos aminoglicosídeos.

Segundo CARMICHAEL & KENNEY¹⁴ (1970), o uso de vacina em cães é impraticável e inseguro, pois induz à infecção crônica e bacteremia.

Atualmente, o único controle efetivo da infecção em cães infectados é a identificação e a eliminação imediata dos mesmos. Estes devem ser identificados por métodos bacteriológicos e sorológicos. A doença pode ser considerada erradicada de uma criação de cães quando todos os animais se apresentarem negativos em 3 exames sorológicos consecutivos. Preconiza-se a introdução de animais novos numa criação quando estes apresentarem 2 exames de soroaglutinação lenta (SAL) negativos, com intervalo de 1 mês (MOORE & GUPTA⁴⁶, 1970; HALL²⁸, 1971; PICKERILL & CARMICHAEL⁵⁵, 1972; ROBERTSON⁵⁷, 1973).

O perigo da transmissão da brucelose canina ao homem tem sido abordado por FAIGEL ¹⁹(1969), FREEMAN ²²(1971) e por WOOLEY e col. ⁸³(1976). Apesar de que o único animal que tem apresentado infecção natural por Brucella canis seja o cão, a doença tem potencial zoonótico devido à estreita relação daquele com o homem (LEWIS JR & ANDERSON ³⁸, 1973), fato este que tem sido comprovado através dos relatos de casos humanos por Brucella canis (CARMICHAEL e col. ¹⁵, 1968; SWENSON e col. ⁶⁶, 1972; BLANKENSHIP & SANDFORD ⁴, 1975; MUNFORD e col. ⁴⁸, 1975; LOVEJOY e col. ⁴⁰, 1976) e também através dos trabalhos de prevalência de anticorpos anti Brucella canis em soros humanos (LEWIS JR & ANDERSON ³⁸, 1973; HOFF & SCHNEIDER ³⁴, 1975; BARG e col. ², 1977; WEBER & BRUNER ⁷⁷, 1977).

A doença no homem caracteriza-se por febre, tremores, indisposição, perda de peso, linfadenopatia (CARMICHAEL e col. ¹⁵, 1968; SWENSON e col. ⁶⁶, 1972; BLANKENSHIP & SANDFORD ⁴, 1975; MUNFORD e col. ⁴⁸, 1975) e por hêpato e esplenomegalias (BLANKENSHIP & SANDFORD ⁴, 1975).

A brucelose canina tornou-se um problema de importância em criações de cães nos Estados Unidos da América do Norte e, atualmente, há evidências de que esta doença está aumentando também entre os homens. As infecções por Brucella canis pareciam estar restritas ao pessoal de laboratório, não constituindo sério problema de Saúde Pública. Recentemente, entretanto, vários casos de infecção humana por Brucella canis têm sido descritos, inclusive aqueles relacionados com infecção em animais domiciliados (WOOLEY e col. ⁸³, 1976).

Considerando-se o risco a que pode estar sujeita uma população humana que, cada vez mais, vem mantendo contacto maior com cães, pretende-se, com o presente trabalho, fornecer alguma contribuição ao estudo da infecção por Brucella canis, visto ser a literatura nacional muito escassa em relação ao assunto. Para tanto estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- a) prevalência da infecção em cães, segundo as provas de soroaglutinação rápida (SAR) e soroaglutinação lenta (SAL) e tipo de criação dos animais;
- b) isolamento de Brucella canis dos animais reagentes;
- c) inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico;
- d) infecção por Brucella canis em humanos.

Antes de se proceder ao item relativo ao material e métodos, fez-se uma revisão da literatura referente ao assunto no período de 1966 a 1978.

2. LITERATURA.

2. LITERATURA.

2.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de soroaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.

O diagnóstico sorológico da brucelose canina, realizado através do teste de aglutinação em tubo, apresenta certas limitações para ser usado rotineiramente em clínicas (CARMICHAEL ¹⁰, 1969). As causas que limitam o seu emprego, de rotina, são as seguintes: a dificuldade de produzir antígeno devido à tendência da Brucella canis de se tornar viscosa após incubação prolongada, a natureza mucóide do organismo que tem sido responsabilizada pela perda de aglutinação completa de alguns soros de cães infectados e a necessidade da mistura teste ser incubada a 50-52°C durante 48 horas (GEORGE & CARMICHAEL ²⁴, 1974).

Na tentativa de sanar estas dificuldades, GEORGE & CARMICHAEL ²⁴ (1974) desenvolveram e avaliaram uma prova de aglutinação rápida em placa para detecção de anticorpos anti Brucella canis, usando cultura de células mortas e coradas de Brucella ovis, com base na identidade antigênica entre as duas espécies de Brucella, e verificaram uma concordância total entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ao examinarem 140 amostras séricas de cães infectados experimentalmente.

BROWN e col. ⁸ (1976) realizaram inquérito sorológico para pesquisa de aglutininas anti Brucella canis em populações caninas errante e domiciliada, usando a soroaglutinação rápida (SAR) como prova de triagem. Os reagentes àquela prova foram reexaminados pela SAL e a avaliação dos resultados indicou uma concordância de 99% entre ambos os testes, uma sensibilidade de 62,5% e uma especificidade de 99,7% para SAR.

Em Minas Gerais, num estudo realizado com 2020 a mostras, pesquisou-se a presença de anticorpos anti Brucella canis em soros humanos, pelo emprego das provas de SAL e SAR, e os resultados obtidos pelos dois métodos foram concordes (BARG e col., ² 1977).

WOOLEY e col. ⁸⁴ (1977) verificaram sensibilidade de 100% e especificidade de 95,7% para a prova de SAR em relação à SAL ao pesquisarem aglutininas anti Brucella canis em soros de populações caninas urbana e rural.

A infecção por Brucella canis foi inicialmente descrita numa criação de Beagles, em Nova Jérsia, em 1966, por CARMICHAEL ¹¹ (1967). Desde então, vários pesquisadores diagnosticaram a doença em outros estados americanos (KIMBERLING e col., ³⁶ 1966; MOORE & BENNET ⁴⁵, 1967; TAUL e col., ⁶⁸ 1967; SPINK & MORISSET ⁶⁵, 1970; HILL e col., ³² 1970; HALL ²⁸, 1971).

Os cães confinados em canis não são os únicos acometidos pela Brucella canis; inquéritos sorológicos têm demonstrado também a prevalência desta infecção em animais errantes e domiciliados (FREDRICKSON & BARTON ²¹, 1974; UEDA e col., ⁷¹ 1974; BROWN e col., ⁷ 1976; HAYASHI & ISAYAMA ³⁰, 1977; LOVEJOY e col., ⁴⁰, 1976; SERIKAWA e col., ⁶³ 1977; WOOLEY e col., ⁸⁴ 1977; PEREIRA FILHO e col., ⁵² 1978; WEBER & SCHLIESSER ⁸¹, 1978).

No Japão, a brucelose canina foi detectada pela primeira vez por YAMAUCHI e col. ⁸⁵ (1974), em criação de Beagles, onde 16 machos e 116 fêmeas foram identificados infectados, através de hemocultura positiva ou título a glutinante igual ou maior a 400; seis meses depois, os referidos autores conseguiram debelar a infecção da criação, através da eliminação dos animais infectados. Neste mesmo ano, UEDA e col. ⁷⁰ (1974) detectaram aborto canino e pizoótico em outra colônia de Beagles em Shizuoka. Ainda no Japão, existem evidências da ocorrência de Brucelose canina, na área de Tokyo (UEDA e col., ⁷¹ 1974; TERAOKA e col.,

⁶⁹ 1978), em Hokaido (HAYASHI & ISAYAMA ³⁰, 1977), em Gifu e Shiga (SERIKAWA e col., ⁶³ 1977) e em Kioto e Kanagawa (SERIKAWA e col., ⁶² 1978).

Von KRUEDENER ⁷⁴ (1974) fêz a primeira observação de brucelose canina em canil de Beagles, na Alemanha. Desde então, outros trabalhos têm confirmado a ocorrência desta infecção naquele país (WEBER & SCHLIESSER ⁸⁰, 1975; WEBER ⁷⁶, 1976; WEBER & SCHULZ ⁸², 1976; WEBER & SCHLIESSER ⁸¹, 1978). Outro país europeu em que a doença já foi diagnosticada é a Tchecoslováquia (SĚBEK e col., ⁶¹ 1976).

Nas Américas existem evidências da infecção por Brucella canis no México (FLORES-CASTRO & SEGURA ²⁰, 1976) no Peru (ENGLEHARDT, 1974, citado por CARMICHAEL ⁹, 1976) e no Brasil (SANDOVAL e col., ⁵⁹ 1976; GODOY e col., ²⁷ 1977 e PEREIRA FILHO e col., ⁵² 1978).

2.2. Isolamento de Brucella canis.

O agente do aborto canino pertence à Ordem Eubacteriales Família Brucellaceae, Gênero Brucella, Espécie Brucella canis (BLAIR e col., ³ 1970) e foi isolado, pela primeira vez, de feto abortado (CARMICHAEL ¹¹, 1967); desde então, a Brucella canis tem sido frequentemente incriminada como causa de infertilidade em cães, em vários locais do mundo.

Segundo CARMICHAEL ¹⁰ (1969), os materiais de escolha para tentativa de isolamento de Brucella canis são: feto abortado, placenta, líquido alantóide, pulmão, fígado, baço, linfonodo, corrimento vaginal de fêmea; isolamentos a partir de epidídimo e próstata não são frequentes. O isolamento do agente a partir de sangue também é possível, sendo que o resultado de hemocultura positiva está relacionado com o nível de anticorpos circulantes.

A maioria dos autores tem conseguido isolar Brucella canis de sangue periférico (CARMICHAEL e col.,¹⁵ 1968; GLEISER e col.,²⁶ 1971; SWENSON e col.,⁶⁶ 1972; YAMAUCHI e col.,⁸⁵ 1974; GODOY e col.,²⁷ 1977).

MOORE & KAKUK⁴⁷ (1969), trabalhando com cães machos naturalmente infectados, não obtiveram sucesso em isolar Brucella canis de tecidos de nenhum animal não bacterêmico; por outro lado, conseguiram isolar o agente dos tecidos de cinco animais bacterêmicos. Urina obtida por punção vesical, em cinco casos, e próstata, em um caso, forneceram cultura positiva, sendo que um dos animais apresentou cultura positiva em ambas amostras (urina e próstata).

MCCORMICK e col.⁴² (1970) conseguiram isolar Brucella canis a partir de fetos abortados e sangue de uma cadela que abortara, recentemente. UEDA e col.,⁷⁰ (1974) citaram o isolamento de Brucella canis a partir de baço, linfonodo, próstata e epidídimo em mais de 50% das amostras e de sangue, testículo e bexiga em 30- 50% das amostras; ainda, conseguiram uma cultura positiva de medula óssea e de útero não grávido. HARRIS e col.,²⁹ (1974) relataram o isolamento de Brucella canis, em cadeia Beagle com sintomatologia neurológica, a partir de líquido cefalorraquidiano.

Isolamentos menos frequentes foram aqueles obtidos por HENDERSON e col.³¹ (1974) a partir do cultivo de fragmentos ósseos obtidos por biópsia de lesões de espondilite, por RIECKE & RHOADES⁵⁶ (1975) e SAEGUSA e col.,⁵⁸ (1977) a partir de material ocular de casos de uveíte e por SCHOEB & MORTON⁶⁰ (1978) a partir de lesão exsudativa de escroto.

2.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.

Poucos são os trabalhos, referentes à inoculação experimental em animais com Brucella canis, que constam da literatura.

JENNINGS e col.³⁵ (1974) e LEWIS JR e col.³⁹ (1973) procederam à inoculação experimental em cães com Brucella canis, com a finalidade de estudar o valor terapêutico de certos antibióticos como tetraciclina, ampicilina e estreptomomicina.

Outro trabalho relativo à inoculação experimental de Brucella canis em cães foi aquele desenvolvido por SAE GUSA e col.⁵⁸ (1977), que observaram o aparecimento de lesões oculares (uveíte) recorrentes, no 217º e 238º dias após a inoculação, em 2 animais com infecção crônica. BROWN e col.⁵ (1975) realizaram inoculação experimental de Brucella canis em cães com o propósito de estudar o desenvolvimento de aglutininas anti Brucella canis e o aparecimento de bacteremia.

Segundo PERCY e col.⁵¹ (1972), quatro símios (Macaca arctoides) inoculados com cultura de Brucella canis reproduziram a doença, confirmada sorologicamente e bacteriologicamente, com reisolamento do agente, a partir de sangue e tecidos.

2.4. Infecção por Brucella canis em humanos.

Atualmente não há dúvidas de que o agente do aborto canino pode acometer o homem, quer acidentalmente por condições de trabalho (CARMICHAEL e col.,¹⁵ 1968), quer em decorrência do contacto com cães infectados (SWENSON e col.,⁶⁶ 1972; BLANKENSHIP & SANDFORD⁴, 1975; MUNFORD e col.,⁴⁸ 1975; LOVEJOY e col.,⁴⁰ 1976).

Os inquéritos sorológicos para pesquisa de aglutininas anti Brucella canis em humanos têm comprovado, também, a suscetibilidade do homem a este agente (LEWIS JR & ANDERSON ³⁸, 1973; HOFF & SCHNEIDER ³⁴, 1975; BARG e col., ² 1977; WEBER & BRUNER ⁷⁷, 1977).

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

Para o isolamento, preparo de antígeno e manutenção das culturas, utilizaram-se os seguintes meios: Brucella - ágar^{*} e Brucella-broth^{*}

Para a execução da prova de SAR, utilizou-se o "kit" "Canine Brucellosis Diagnostic Test"^{**}. O antígeno para realização da prova de SAL foi preparado a partir de Brucella canis (RM 6-66)^{***} e o controle das partidas de antígeno foi feito utilizando-se anti-soro^{***}, preparado em cão.

Para a avaliação estatística dos resultados, utilizaram-se: o cálculo do coeficiente de associação de Yule e o cálculo de mediana (MARASCUILLO⁴¹, 1971).

3.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de so roaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.

Examinaram-se trezentos e sessenta e quatro soros de cães adultos, sem distinção de sexo e raça, sendo cento e sessenta e quatro procedentes de canis e duzentos errantes^{****}. Os canis, cujos animais foram incluí

* Difco.

** Gentilmente cedido pela Pitman-Moore, através do Senhor Doutor Richard Pohl da Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil.

*** Gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Leland E. Carmichael da Universidade de Cornell, Ithaca, Nova Iorque, E. U.A.

**** Gentilmente cedidos pelo Doutor Paulo Hideki Yassuda do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

dos nesta pesquisa, eram constituídos por 4-50 animais. Destes eram coletadas amostras de 5 ml de sangue da veia jugular direita e/ou esquerda, seguindo-se os devidos cuidados de assepsia e, imediatamente, centrifugadas a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, para separação e obtenção dos soros. Foram utilizados somente os soros não hemolisados, que eram estocados a -20°C , até o momento da realização das provas sorológicas.

Utilizou-se, no presente trabalho, o Teste Diagnóstico para Brucelose Canina (Pitman-Moore) para a realização da prova de SAR.

O procedimento para execução da referida prova foi o seguinte:

- a) sobre uma lâmina de vidro, colocavam-se 1 gota de soroproblema numa extremidade e 1 gota de anti-soro (controle positivo) noutra extremidade;
- b) adicionava-se uma gota de antígeno corado a cada uma das gotas de soro; homogeneizava-se cada mistura antígeno-soro com um bastão aplicador, espalhando-a numa área circular de aproximadamente 2 cm de diâmetro;
- c) a leitura da prova era feita dentro de 2 minutos, agitando-se a lâmina lenta e cuidadosamente;
- d) consideravam-se positivas as misturas antígeno-soro que aglutinassem em 2 minutos; por outro lado, consideravam-se negativas aquelas que não aglutinassem no mesmo tempo de observação.

A prova de soroaglutinação lenta foi realizada segundo a técnica preconizada por CARMICHAEL (1976)*, obedecendo

* Informação pessoal de L.E. Carmichael do Cornell Research Laboratory for Diseases of Dogs, Ithaca, N.Y. -Standard tube agglutination test protocol for Brucella canis diagnosis, 1976.

decendo as recomendações descritas a seguir.

Preparação de antígeno: o antígeno para método lento era preparado a partir de culturas de Brucella canis (RM 6-66), com 48-72 horas de crescimento, em garrafas de Roux contendo Brucella-ágar. As colônias de bactérias eram removidas com a adição de 25 ml de solução tamponada (pH 7,2 e 0,15M). A suspensão resultante era filtrada, através de seis camadas de gaze, e lavada duas vezes com a referida solução tamponada, por meio de centrifugação a 10.000 r.p.m., durante 20 minutos. Após a segunda lavagem, o sedimento era ressuspenso em aproximadamente 10 ml da citada solução tamponada e mantido em banho-maria, a 60-62°C durante 2 horas, obtendo-se, desta forma, antígeno morto. Para evitar contaminação, adicionava-se Merthiolate 0,01%. O antígeno concentrado, assim obtido, era armazenado a 4°C, até o momento do uso. Para a realização da prova, o antígeno era diluído à densidade óptica de 0,2, em comprimento de onda de 420 nm, em espectrofotômetro Coleman Jr. II, modelo 6/20.

O procedimento para execução da prova de soroglutinação lenta foi o seguinte:

- a) uma bateria de tubos de ensaio 12 x 75 mm eram numerados de 1 a 7;
- b) com uma pipeta de 0,1 ml, colocavam-se 0,04, 0,02, 0,01 e 0,005 ml de soro, respectivamente, nos tubos 1, 2, 3 e 4. A seguir, preparava-se uma solução diluída de soro (1:10), em solução tamponada (pH 7,2 e 0,15M) que era colocada nas quantidades de 0,08, 0,04 e 0,02 ml, respectivamente, nos tubos 5, 6 e 7;
- c) para obtenção das diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500 e 1:1.000, adicionavam-se, a cada tubo, 2 ml de antígeno diluído; a seguir, os tubos eram incubados, em estufa a 50-52°C, durante 48 horas;

- d) finalizando, realizavam-se duas leituras: uma após 24 horas de incubação e a segunda após 48 horas de incubação. Os resultados eram avaliados comparando-se o grau de turvação das reações nos tubos transparentes, contendo soro desconhecido e aquele contendo soro controle. Consideravam-se positivos os soros, em cujos tubos não havia reação com turvação, indicando aglutinação e formação de complexo antígeno-anticorpo, que se precipitava no fundo dos tubos; consideravam-se negativos os soros em cujos tubos permaneciam reações com turvação, após 48 horas de incubação;
- e) consideravam-se positivos os soros que apresentassem aglutinação em diluições iguais ou maiores a 100.

3.2. Isolamento de Brucella canis.

As tentativas de isolamento de Brucella canis foram feitas em cães confinados e em animais errantes, utilizando-se dezessete animais adultos, sem distinção de sexo e raça, pertencentes a um mesmo canil com história passada de infertilidade, assim como dez animais errantes. Coletava-se de cada animal uma amostra de 2 ml de sangue, destinada à realização de hemocultura.

Hemocultura: para comprovação de bacteremia e isolamento do agente utilizando amostras sanguíneas, coletavam-se, assepticamente, 2 ml de sangue da veia jugular direita e/ou esquerda. Imediatamente, o material era colocado em tubos, contendo 5 ml de Brucella-broth, com citrato de sódio a 0,1%, e incubado a 37°C durante 5 dias. Após este período de incubação, em meio específico, o material era semeado em placas de Brucella-ágar e incubado a 37°C. O crescimento de colônias de Brucella canis era observado após 48-72 horas de incubação. A seguir, procedia-se ao exame das características morfológicas e bioquímicas do agente.

Na determinação das características morfológicas consideraram-se: a forma do microrganismo, as características tintoriais pela coloração de Gram, a forma e o aspecto das colônias e o tempo de incubação para crescimento das mesmas.

As características bioquímicas foram avaliadas mediante as seguintes provas: catalase, oxidação e fermentação no meio de Hughes-Leifson, motilidade em ágar semissólido, glicose e acidificação e hidrólise da uréia, provas estas utilizadas, comumente, para caracterização do gênero Brucella. (BLAIR e col., ³ 1970). Para identificação da espécie Brucella canis utilizaram-se, ainda, a prova de produção de H_2S e a verificação de crescimento de colônias, em presença de diferentes concentrações de corantes (tioni na e fucsina).

3.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.

Para a inoculação experimental, utilizaram-se oito animais adultos, três fêmeas e cinco machos, sem raça definida, selecionados através exames clínico e laboratorial (hemograma e exame de urina), não reagentes para as provas de SAR e SAL e com hemocultura negativa para Brucella canis. Os animais foram identificados pelos números: 201, 203, 206, 209, 214, 216, 218 e 219. Antes de serem incluídos no experimento, foram imunizados contra Cinomose e Hepatite Infecciosa Canina e receberam, também, tratamento anti-helmíntico (Mebendazole, na dose de 30 mg/kg/dia, durante 3 dias). Assim preparados, os animais foram mantidos isolados e em observação por 30 dias. Após este período de isolamento, os cães foram examinados, novamente, por meio de provas sorológicas e, então, inoculados com uma suspensão de Brucella canis (ES 11/78), isolada no presente trabalho. Esta foi preparada à

semelhança do antígeno para SAL; todavia, deve-se destacar que este inóculo não foi aquecido a 60-62°C, bem como não recebeu adição de Merthiolate. A suspensão concentrada da citada amostra foi diluída, segundo o tubo 3 da Escala de McFarland, sendo inoculada, nos animais deste grupo experimental, na dose de 1 ml por via oral.

A partir de um tempo zero, correspondente à data da inoculação, os cães foram sangrados, a intervalos de 7 dias, até a ocasião do sacrifício, para a realização das provas sorológicas, já descritas no item 3.1., e hemocultura descrita no item 3.2. Nas duas primeiras coletas, colheu-se material apenas para a execução das provas sorológicas; a partir da 3a. coleta, obtinha-se sangue para separação de soro, destinado às provas sorológicas, assim como para hemocultura.

Os cães de números 206, 209, 216 e 218 foram observados durante 49 dias; os quatro animais restantes, isto é, os de números 201, 203, 214 e 219 foram mantidos por mais 42 dias, totalizando 91 dias de observação após a inoculação.

3.4. Infecção por Brucella canis em humanos.

Trezentos e trinta soros humanos* foram examinados para pesquisa de aglutininas anti Brucella canis. Os soros foram mantidos a -20°C até o momento da execução da prova de SAL, descrita no item 3.1., utilizando-se apenas aqueles em evidência de hemólise.

* Gentilmente cedidos pelo Laboratório Clínico do Centro de Saúde de "Geraldo de Paula Souza" da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO.

4.1. Prevalência da infecção em cães, segundo as provas de so roaglutinação rápida e soroaglutinação lenta e tipo de criação dos animais.

Conforme se visualiza na TABELA Nº 1 observou-se, no presente trabalho, segundo a prova de SAR, uma prevalência de 15 reagentes (9,1%) entre os animais de canil e de 15 reagentes (7,5%) entre os animais de rua. Segundo a prova de SAL, a prevalência observada foi de 4 positivos (2,4%) em relação aos animais de canil e de 14 positivos (7,0%) para os animais errantes.

TABELA Nº 1 - Animais da espécie canina, segundo resultados das provas de SAR e SAL para Brucella canis, e tipo de criação. São Paulo, 1979.

Provas Tipo Resul- de ta criação dos	S A R		Total	S A L		Total
	Positivos	Negativos		Positivos	Negativos	
	Freq. %	Freq. %		Freq. %	Freq. %	
CANIL	15 9,1	149 90,9	164	4 2,4	160 97,6	164
ERRANTE	15 7,5	185 92,5	200	14 7,0	186 93,0	200

GALPHIN JR. ²³ (1977), realizando um inquérito sorológico para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis, obteve seis reagentes pela prova de SAR, dos quais apenas um foi positivo pela prova de SAL. À semelhança do que observou o citado autor, os resultados obtidos no presente trabalho, relativos à comparação entre as provas de SAR e SAL, permitem reconhecer a prova de SAR como um teste bastante específico para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis, porém, que pode fornecer resultados falso-positivos.

Por outro lado, resultados referentes à concordância entre as provas de SAR e SAL foram observados por vários autores (DAMP e col. ¹⁸, 1973; GEORGE E CARMICHAEL²⁴, 1974; BROWN e col. ⁸, 1976; WOOLEY e col. ⁸⁴, 1977). Assim, ao examinarem soros humanos e de cães por meio das provas de SAR e SAL para pesquisa de aglutininas anti Brucella canis, DAMP e col. ¹⁸ (1973) verificaram que o teste de microaglutinação em placa produz resultados semelhantes àqueles obtidos pelo método padrão, concluindo, ainda, que aquele método constitui um meio econômico de triagem para este tipo de avaliação. GEORGE E CARMICHAEL²⁴ (1974) desenvolveram e avaliaram um teste de aglutinação rápida em placa, para detecção de anticorpos anti Brucella canis, usando células mortas e coradas de Brucella ovis, o que é possível devido à identidade antigênica entre ambas espécies de Brucella. Num estudo que abrangeu um total de 140 amostras de soros examinadas, os autores obtiveram uma concordância de resultados entre os dois testes, isto é, SAR e SAL.

BROWN e col. ⁸ (1976), realizaram um inquérito sorológico, para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis, em populações caninas errante e domiciliada, mediante a prova de SAR, sendo que os animais reagentes para esta prova foram reexaminados pela SAL, e verificaram uma concordância de 99% entre ambos os testes. A reavaliação dos dados obtidos pelos autores indicou que a prova de SAR apresenta uma sensibilidade de 62,5% e uma especificidade de 99,7% quando comparada à SAL.

WOOLEY e col. ⁸⁴ (1977) realizaram um inquérito sorológico em populações caninas rural e urbana da Geórgia, utilizando as provas de SAR e SAL para detecção de aglutininas anti Brucella canis, e verificaram, ao comparar ambos os testes, que a prova de SAR apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 95,7% em relação à SAL. Os resultados obtidos por BROWN e col. ⁸ (1976) e por WOOLEY e col. ⁸⁴ (1977), relativos à sensibilidade e especificidade do teste de SAR, caracterizam esta prova

como um bom meio de triagem para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis em amostras séricas.

Posteriormente, pretende-se realizar um estudo comparativo entre as provas de SAR e SAL, com a finalidade de avaliar a sensibilidade e a especificidade da primeira em relação à segunda.

Existem também trabalhos referentes à comparação de outros testes como ágar-precipitação (WEBER & KRAUSS⁷⁹, 1975) e gel-difusão em lâminas (MYERS e col.,⁴⁹ 1974) com a prova de SAL. De um modo geral, os resultados obtidos por aqueles testes são comparáveis aos obtidos pela prova de SAL, o que os faz indicar como uma prova suplementar à da SAL.

Segundo a prova de SAL, a mediana do título de anticorpos foi 100 em relação aos animais criados em sistema de canil, enquanto que para os cães de rua o valor foi 250, como se observa, respectivamente, nas TABELAS Nº 2 e Nº 3.

TABELA Nº 2 - Frequência dos títulos de anticorpos anti Brucella canis, em animais criados em canis, segundo a prova de SAL. São Paulo, 1979.

Título	Frequência
100	2
200	1
250	-
400	-
500	-
1000	1

TABELA Nº 3 - Frequência dos títulos de anticorpos anti Brucella canis em cães errantes, segundo a prova de SAL. São Paulo, 1979

Título	Frequência
100	3
200	3
250	2
400	1
500	1
1000	4

HOFF & NICHOLS ³³ (1974), na Flórida, realizando um inquérito sorológico envolvendo 247 animais de canil, obtiveram uma porcentagem de soropositividade igual a 3,65, através da prova de SAL, resultado bastante semelhante ao obtido no presente trabalho.

Outros trabalhos atinentes à prevalência da brucelose canina em animais confinados em canil fornecem resultados que variam de 10,3% a 43,3%. Von KRUEDENER ⁷⁵ (1976), na Alemanha,,examinando 200 soros de cães de uma criação de Beagles, obteve uma prevalência de 39% de reagentes, considerando título positivo igual ou maior a 400. Por outro lado, WEBER ⁷⁶ (1976) e WEBER & SCHULZ ⁸² (1976) examinando 1190 e 650 soros, respectivamente, encontraram as seguintes porcentagens de soropositivos:10,3 e 10,5, com títulos variando de 50 a 600. SEBEK e col. ⁶¹ (1976), na Tchecoslováquia, obtiveram uma prevalência de 43,3% de reagentes para Brucella canis de um total de 171 animais examinados.

No referente aos animais errantes, encontrou-se, no presente trabalho, uma prevalência de anticorpos anti Brucella canis igual a 7,5% (15 reagentes), através da prova de SAR, e igual a 7% (14 reagentes), através da prova de SAL. Estes resultados estão concordes com aquese

les de: FREDRICKSON & BARTON ²¹ (1974) que obtiveram uma prevalência de 6,6% de brucelose canina entre animais errantes, no Tenessi, considerando título igual ou maior a 200 como indicativo de infecção; BROWN e col. ⁸ (1976) , que de um total de 100 amostras séricas de cães errantes, observaram 9 (9%) com título igual ou maior a 100; de WOOLEY e col. ⁸⁴ (1977) que também obtiveram 9% de soros positivos, pela prova de SAL, em população canina urbana errante. Resultados de prevalência bem mais baixa foram encontrados por UEDA e col. ⁷¹ (1974) e SANDOVAL e col. ⁵⁹ (1976) que observaram, respectivamente, 3,65% e 3,61% de animais reagentes para Brucella canis. Apesar de não fornecer a porcentagem de prevalência encontrada, LOVEJOY e col. ⁴⁰ (1976) citaram que a totalidade dos animais positivos pertencia à população de cães errantes.

Os trabalhos relativos à prevalência de brucelose canina na população de animais domiciliados mostram dados que variam de 1 a 2,9% (BROWN e col., ⁷ 1976; SERIKAWA e col., ⁶³ 1977; PEREIRA FILHO e col., ⁵² 1978; WEBER & SCHLIESSER ⁸¹, 1978), através do teste de SAL, considerando título igual ou maior a 100.

Na presente pesquisa, os canis, cujos animais foram examinados, eram constituídos por 4-50 cães apresentando, assim, um caráter mais domiciliar do que de criação, sendo, portanto, mais fácil detectar e controlar qualquer tipo de infecção. Este fato pode ser a justificativa da baixa prevalência da infecção relativa aos cães de canil, encontrada no presente trabalho, assim como a mediana do título de anticorpos mais baixa neste grupo de animais quando comparada à dos cães de rua.

4.2. Isolamento de Brucella canis.

Dezessete animais adultos, sem distinção de sexo e raça, pertencentes a um mesmo canil com antecedentes de infertilidade, foram examinados, por 3 ocasiões, para detecção de anticorpos anti Brucella canis, através das provas de SAR e SAL, assim como por meio de hemocultura, para tentativa de isolamento do agente a partir de sangue. Na terceira tentativa, obteve-se resultado positivo de um animal.

Ao realizar a seleção dos animais para inoculação experimental, encontraram-se dois, portadores de altos níveis de aglutininas anti Brucella canis circulantes. Diante de tais achados, procedeu-se à coleta de sangue para hemocultura e esta foi positiva para ambos.

O agente etiológico isolado dos três animais tratava-se de um cocobacilo, Gram negativo; as colônias apresentavam-se pequenas, circulares, de coloração branco grisáceo, cremosas e cresciam após 48 horas de incubação. O crescimento bacteriano tornava-se mucóide após 5 - 7 dias de incubação.

A identificação bioquímica dos agentes isolados dos três animais foi a seguinte: catalase⁺, oxidação e fermentação⁻, motilidade⁻, glicose e acidificação⁻, uréia⁺, produção de H₂S⁺ (em 6 dias). O crescimento de colônias, em presença de diferentes concentrações de corantes, comportou-se da seguinte forma:

tionina 1: 25.000: +	fucsina 1: 50.000: -
1: 50.000: +	1:100.000: +
1:100.000: +	

As amostras isoladas dos 3 animais apresentaram as mesmas características morfológicas e bioquímicas, quando comparadas à amostra padrão (RM6-66).

As cepas isoladas foram liofilizadas e enviadas para identificação e tipificação. A primeira cepa isolada, de animal de canil, foi enviada ao Prof. Dr. Leland E. Carmichael que confirmou nossas observações e o isolado foi denominado Brucella canis (ES 11/78). As outras duas cepas isoladas foram enviadas ao Centro Panamericano de Zoonoses e receberam as respectivas denominações de Brucella canis (Pr/79) e Brucella canis (215/79).

Por meio de hemocultura, foram isoladas três amostras de Brucella canis: (ES 11/78), Brucella canis (Pr/79) e Brucella canis (215/79) que apresentaram as mesmas características morfológicas e bioquímicas da amostra padrão (RM6-66); os animais, dos quais foram obtidos os isolamentos, eram portadores de títulos aglutinantes iguais ou maiores a 400. Estas observações são semelhantes às de GLEISER e col.²⁶ (1971) e às de YAMAUCHI e col.⁸⁵ (1974), que obtiveram, também, hemocultura positiva de animais com títulos iguais ou maiores a 400. GODOY e col.²⁷ (1977) encontraram um animal com título aglutinante igual a 200 e que também forneceu hemocultura positiva.

O agente etiológico do aborto canino apresenta características morfológicas e bioquímicas, já descritas anteriormente, que são utilizadas para sua identificação. Entretanto, entre uma amostra e outra podem ocorrer pequenas variações, como produção lenta de H_2S (CARMICHAEL e BRUNER¹², 1968; McCORMICK e col.,⁴² 1970) e crescimento em pequenas concentrações de fucsina (SWENSON e col.,⁶⁶ 1972; VERGER e col.,⁷³ 1975).

Segundo ALTON e col.¹ (1976), Brucella canis não produz H_2S (em 4 dias), enquanto que CARMICHAEL¹⁰ (1969) cita a produção de H_2S em 6 - 7 dias; relativamente ao crescimento de colônias em diferentes concentrações de corantes, tanto ALTON e col.¹ (1976) como CARMICHAEL¹⁰ (1969) consideram crescimento favorável de Brucella canis em presença de qualquer concentração de

tionina e crescimento negativo em presença de fucsina na concentração de 1:50.000; entretanto, no referente ao crescimento de Brucella canis, em presença de fucsina, na concentração de 1:100.000, ALTON e col.¹ (1976) consideram negativo ou positivo, ao passo que CARMICHAEL¹⁰ (1969) considera crescimento positivo.

4.3. Inoculação experimental em cães: estudos bacteriológico e sorológico.

Dos oito animais inoculados experimentalmente, com Brucella canis (ES 11/78), isolada no presente trabalho, sete demonstraram sinais de infecção, que foi comprovada através de provas sorológicas, isto é, provas de SAR e SAL, assim como por meio de hemocultura positiva.

Os resultados relativos à prova de SAL e hemocultura foram apresentados sob a forma de gráfico, para cada animal, individualmente, com exceção daquele que não apresentou evidências bacteriológicas ou sorológicas da infecção. (animal nº 201). (GRÁFICOS Nº 1 a Nº 7). Ainda, para uma melhor visualização dos resultados obtidos, fez-se uma tabela em que são computados os resultados, de todos os animais, relativos à prova de SAL e hemocultura, no decorrer de todo o experimento. (TABELA Nº 4).

GRÁFICO Nº 1 - Animal inoculado (nº 203) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

* Hemocultura positiva.

O animal nº 203 começou a apresentar anticorpos circulantes a partir do 28º dia após a inoculação, elevando, gradativamente, os níveis até atingir título 1.000 no 49º dia de observação. Título este mantido até o final do período de observação de 91 dias.

No 28º dia após a inoculação, embora portador de um título de anticorpos, relativamente baixo, o animal 203 apresentou hemocultura positiva, que negativou na coleta seguinte, voltando a positivar nas oito coletas subsequentes.

GRÁFICO Nº 2 - Animal inoculado (nº 206) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

* Hemocultura positiva.

O animal nº 206 apresentou título inicial positivo igual a 50 no 28º dia de observação; na coleta seguinte, no 35º dia o título elevou-se para 250, atingindo valor 1.000 no 42º dia após a inoculação e caindo para 500 no 49º dia de observação.

A Hemocultura positiva foi detectada, inicialmente, no 28º dia de observação e perdurou até o final do experimento (49º dia).

GRÁFICO Nº 3 - Animal inoculado (nº 209) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

* Hemocultura positiva.

O animal nº 209 apresentou título positivo igual a 50 já no 14º dia de observação; na coleta seguinte, no 21º dia, apresentou título negativo e no 28º dia voltou a ser reagente para anticorpos anti Brucella canis, pela prova de SAL. A partir de então, elevou o título para 250, no 35º dia, e para 1.000, no 42º dia de observação; entretanto, na última coleta, realizada no 49º dia após a inoculação, baixou o título para 400.

A hemocultura positiva neste animal foi detectada, inicialmente, no 21º dia após a inoculação, assim permanecendo até o final do período de experimentação.

GRÁFICO Nº 4 - Animal inoculado (nº 214) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

* Hemocultura positiva:

O animal nº 214 apresentou título inicial, relativamente elevado, igual a 200, no 35º dia após a inoculação, nas duas coletas subsequentes, baixou o nível de anticorpos para 50. No 56º dia, o título elevou-se para 250, e sete dias após, chegou ao nível 1.000 e assim permaneceu até o final do experimento.

O Gráfico nº 4 permite visualizar que o animal nº 214 apresentou hemocultura positiva, pela primeira vez, apenas no 49º dia após a inoculação, ocasião em que era portador de um nível baixo de anticorpos; na coleta seguinte, no 56º dia, a hemocultura foi novamente positiva, negativando no 63º dia de observação. Nas 4 coletas subsequentes, a hemocultura foi positiva, caracterizando a bacteremia.

GRÁFICO Nº 5 - Animal inoculado (nº 216) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

* Hemocultura positiva

O animal nº 216 apresentou uma resposta imunológica com título 100 apenas no 35º dia após a inoculação; sete dias após, o título havia elevado para 1.000 e se manteve assim até o 49º dia de observação, ocasião em que o animal foi sacrificado.

A hemocultura positiva foi detectada, pela primeira vez, no 28º dia após a inoculação, mesmo na ausência de anticorpos circulantes; foi igualmente observada na coleta seguinte, negatizando no 42º dia e, positivando, novamente, no 49º dia de observação.

GRÁFICO Nº 6 - Animal inoculado (nº 218) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de anticorpos

* Hemocultura positiva

O animal nº 218 apresentou título inicial a 100 no 21º dia após a inoculação; na coleta seguinte, elevou o título para 250, valor este mantido também no 35º dia de observação. Nas duas coletas subsequentes, o nível de anticorpos foi igual a 1.000.

Este animal forneceu hemocultura positiva apenas em duas ocasiões, isto é, no 21º dia e 42º dia de experimentação.

GRÁFICO Nº 7 - Animal inoculado (nº 219) com Brucella canis (ES 11/78), segundo curva de anticorpos anti Brucella canis, avaliados pela prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

* Hemocultura positiva

O animal nº 219 apresentou uma resposta imunológica precoce, com título 100, já no 14º dia após a inoculação. Nas duas coletas seguintes, não foi possível detectar anticorpos circulantes e, no 35º dia, o nível de anticorpos foi da ordem de 50, elevando-se, abruptamente, na coleta seguinte, para 1.000, valor que se manteve até o final do experimento.

A hemocultura positiva uma vez detectada, no 35º dia de observação, perdurou até o 91º dia, ocasião em que o animal foi sacrificado.

TABELA Nº 4 - Animais inoculados com Brucella canis (ES 11/78), segundo título aglutinante, hemocultura e tempo, em dias, decorrido da inoculação. São Paulo, 1979.

Tempo (dias)	7		14		21		28		35		42		49		56		63		70		77		84		96	
ANIMAL Nº	Resultados																									
	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura	Título	hemocultura
201	-	...	-	...	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
203	-	...	-	...	-	-	50	+ 100	-	500	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+
206	-	...	-	...	-	-	50	+ 250	+ 1000	+ 500	+	*														
209	-	...	50	...	-	+	50	+ 250	+ 1000	+ 400	+	*														
214	-	...	-	...	-	-	-	200	-	50	-	50	+	250	+ 1000	-	1000	+	1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+
216	-	...	-	...	-	-	-	+ 100	+ 1000	-	1000	+	*													
218	-	...	-	...	100	+ 250	-	250	-	1000	+ 1000	-	*													
219	-	...	100	...	-	-	-	50	+ 1000	+ 1000	+	1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+ 1000	+

(*) Animais sacrificados após 49 dias de observação.

Calculando-se a mediana semanal dos níveis de anticorpos anti Brucella canis de todos os animais inoculados, construiu-se o perfil da curva dos níveis de anticorpos anti Brucella canis, em animais inoculados experimentalmente (Gráfico nº 8).

GRÁFICO Nº 8 - Evolução da mediana dos níveis de anticorpos anti Brucella canis em cães inoculados experimentalmente com Brucella canis (ES 11/78), segundo tempo, em dias, decorrido da inoculação. São Paulo, 1979.

Título de
anticorpos

Considerando-se para cada coleta de sangue duas determinações, isto é, prova de SAL e hemocultura, verificou-se que 100 é o título que, mais frequentemente, oferece hemocultura positiva como se verifica na TABELA Nº 5 e que há uma associação positiva e de intensidade 0,95, entre os fenômenos reagentes para SAL e hemocultura, quando medida pelo coeficiente de associação de Yule (MARASCUILLO ⁴¹, 1971), conforme se visualiza na TABELA Nº 6.

TABELA Nº 5 - Animais inoculados experimentalmente com Brucella canis (ES 11/78), segundo hemocultura e título aglutinante, avaliado pela prova de SAL. São Paulo, 1979.

Hemocultura Título (SAL)	Positiva	Negativa
Negativo	2	18
50	5	1
100	2	1
200	-	1
250	3	2
400	1	-
500	2	-
1000	23	3

TABELA Nº 6 - Animais inoculados experimentalmente com Brucella canis (ES 11/78), segundo a prova de SAL e hemocultura. São Paulo, 1979.

Hemocultura (SAL)	Positiva	Negativa
reagente	36	8
não reagente	2	18
TOTAL	38	26

Dos oito animais inoculados experimentalmente com Brucella canis (ES 11/78), sete apresentaram evidências bacteriológicas e sorológicas da infecção, sendo que apenas um animal, o de nº 201, não desenvolveu título de anticorpos anti Brucella canis, detectáveis pelos métodos soroló

gicos utilizados no presente trabalho, e tampouco apresentou hemocultura positiva, durante todo o período de observação de 91 dias. Provavelmente, a quantidade de microrganismos inoculadas neste animal não foi suficiente para que ele se infectasse, ou, ainda, tratava-se de um animal imune, imunidade esta conferida por uma infecção anterior, pois organismos intra celulares como a Brucella geram estado de hipersensibilidade retardada (CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴, 1970; SYMPOSIUM ON IMMUNITY...⁶⁷, 1970).

PERCY e col. ⁵¹ (1972), BROWN e col. ⁶ (1973). LEWIS JR e col. ³⁹ (1973) e JENNINGS e col. ³⁵ (1974) desenvolveram também trabalhos de inoculação experimental com Brucella canis em cães, com exceção de PERCY e col. ⁵¹ (1972) que trabalharam com símios, conseguindo demonstrar evidências sorológicas e bacteriológicas em todos os animais inoculados.

Embora a técnica, relativa à prova de SAL empregada no presente trabalho, considere reagentes os animais cujos soros aglutinam em diluição igual ou maior a 1:100, no ítem referente à inoculação experimental, consideraram-se reagentes os cães inoculados, cujos soros apresentaram aglutinação em diluição menor àquela, pois eles forneceram, simultaneamente, hemocultura positiva. Esta condição foi verificada nos animais de números 203, 206 e 209 no 28º dia, no animal nº 214 no 49º dia e no animal nº 219 no 35º dia após inoculação. Assim, conseguiu-se detectar nível inicial de anticorpos aglutinantes 14 a 35 dias após a inoculação experimental; resultados semelhantes foram obtidos por BROWN e col. ⁶ (1973), LEWIS JR e col. ³⁹ (1973), JENNINGS e col. ³⁵ (1974) e BROWN e col. ⁵ (1975) que detectaram títulos iniciais, respectivamente, 4 semanas, 9 a 19 dias, 4 semanas e 14 dias após a exposição dos animais ao agente infectante. As observações acima citadas justificam a realização da diluição 1:50, na sequência de diluições de soro na prova de SAL para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis, assim como, a realização de hemocultura perante os soros reagentes em baixas diluições.

Relativamente à hemocultura, esta foi detectada inicialmente 21 a 49 dias após a inoculação experimental. MOORE ⁴⁴ (1969), CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴ (1970), BROWN e col. ⁶ (1973), LEWIS JR e col. ³⁹ (1973) e BROWN e col. ⁵ (1975) detectaram bacteremia inicial, respectivamente, 4 semanas, 1 a 3 semanas, 8 a 23 dias, 6 a 21 dias e 14 dias após a exposição dos suscetíveis ao agente infectante.

Contrariamente às observações de CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴ (1970), PERCY e col. ⁵¹ (1972) e BROWN e col. ⁶ (1973), detectou-se bacteremia em todos as coletas apenas em 3 animais (nºs 206, 209 e 219); os demais apresentaram resultados irregulares em relação à hemocultura, à semelhança do que verificaram VAN HOOSIER JR. e col. ⁷² (1970), em 2 recém-nascidos, que nasceram de mãe infectada, e apresentaram hemocultura positiva no 3º dia de vida e hemocultura negativa nas coletas subsequentes.

Os resultados obtidos no presente trabalho são concordes com os de MOORE & GUPTA ⁴⁶ (1970) no que diz respeito à verificação dos níveis mais elevados de anticorpos circulantes em animais bacterêmicos; entretanto, as afirmações dos mesmos autores da não ocorrência de título 800 sem bacteremia, não foram observadas no presente trabalho, pois de 35 resultados de SAL com títulos iguais ou maiores a 200, título este indicativo de infecção ativa, 29 forneceram hemocultura positiva e 6 foram negativos para cultura de sangue (TABELA Nº 5).

Segundo CARMICHAEL & KENNEY ¹⁴ (1970), a Brucella canis pode ser isolada do sangue (porção leucocitária) poucos dias antes do aparecimento de níveis detectáveis de anticorpos aglutinantes; de forma análoga, observe-se, no presente trabalho, hemocultura positiva de 2 animais que não apresentavam aglutininas anti Brucella canis detectáveis pela prova de SAL (animal nº 209 no 21º dia após a inoculação e animal nº 216 no 28º dia após a inoculação, conforme TABELA Nº 4).

4.4. Infecção por Brucella canis em humanos.

Dos trezentos e trinta soros humanos examinados pela prova de SAL, encontraram-se quatro positivos para Brucella canis, dando uma prevalência de 1,21%.

Dentre os trabalhos relativos à prevalência de aglutininas anti Brucella canis em soros humanos, podem-se citar os de: HOFF & SCHNEIDER³⁴ (1975) que encontraram 3 (0,99%) reagentes de um total de 303 amostras examinadas; LEWIS JR & ANDERSON³⁸ (1973) que, examinando 1208 soros de recrutas militares americanos, através da prova de SAL, encontraram uma porcentagem de soropositividade de 0,41; FLORES-CASTRO & SEGURA²⁰ (1976) que, dentre 203 soros humanos examinados, observaram 27, ou seja, 13,3%, positivos; BARG e col.² (1977) que observaram uma prevalência de 0,81% de reagentes para anticorpos anti Brucella canis de um total de 2020 soros humanos (doadores de sangue), através das provas de SAR e SAL; WEBER & BRUNER⁷⁷ (1977) que, dentre 1915 soros humanos, detectaram anticorpos aglutinantes contra Brucella canis em 6 amostras (0,31%), através do teste de SAL.

O resultado obtido, no presente trabalho, relativo à prevalência de anticorpos anti Brucella canis em soros humanos (1,21%), pela prova de SAL, é concorde com os dos autores acima citados, com exceção do de FLORES-CASTRO & SEGURA²⁰ (1976).

Constam da literatura médica, vários trabalhos referentes a relatos de casos humanos de doença por Brucella canis. CARMICHAEL e col.¹⁵ (1968) foram os primeiros a descrever a infecção no homem, em 2 laboratoristas, que se infectaram acidentalmente, trabalhando com amostras de Brucella canis. SWENSON e col.⁶⁶ (1972), descreveram o primeiro caso humano de infecção por Brucella canis adquirido em consequência do contacto com a

nimal doente. O paciente envolvido tratava-se de uma mulher de 23 anos de idade, portadora de doença cardíaca reumática, que apresentava febre, tremores e faringite. Sua hemocultura foi positiva para Brucella canis e seu título aglutinante igual a 200. Através de investigação epidemiológica, incriminou-se um animal da espécie canina, fêmea, com hemocultura positiva, como sendo a fonte de infecção; os demais elementos da família eram todos negativos para hemocultura e presença de anticorpos aglutinantes. MUNFORD e col.⁴⁸ (1975) relataram outros 2 casos humanos de infecção por Brucella canis em indivíduos não envolvidos, profissionalmente, ao risco da infecção e que apresentaram sintomas tais como febre, arrepios, indisposição e perda de peso; em ambos os casos a provável fonte de infecção foi o animal de estimação. BLANCKENSHIP & SANDFORD⁴ (1975) incriminaram uma cadela de 2 anos de idade, com título aglutinante de 200, como fonte de infecção de mais um caso humano de doença por Brucella canis, envolvendo um homem de 48 anos de idade, com os seguintes sintomas: febre intermitente e bacteremia de 4 meses de duração. Ao exame clínico detectaram-se ainda: linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalias e sinais de processo infeccioso agudo. O paciente em questão apresentava título aglutinante contra Brucella canis igual a 500 e hemocultura positiva. Os demais elementos da família foram todos negativos à diluição de 1:50 para pesquisa de anticorpos anti Brucella canis. LOVEJOY e col.⁴⁰ (1976) descreveram, no Tennessee, outro caso de infecção humana por Brucella canis em um jovem de 18 anos de idade que adquiriu a doença através do contacto com seu animal de estimação que, na ocasião, era portador de altos níveis de anticorpos circulantes.

Assim sendo, segundo CENTER FOR DISEASE CONTROL¹⁶ (1977), existem relatados na literatura médica, no período de 1967-1974, 16 casos humanos de infecção por Brucella canis. Em 11 deles, o diagnóstico foi baseado no isolamento do agente; 5 deles foram diagnosti-

cados sorologicamente por testes de aglutinação específica para Brucella canis, sendo que 2 deles foram confirmados por testes subsequentes com elevação do título, e nos 3 restantes fêz-se diagnóstico presuntivo com base em título único e estável igual ou maior a 100. Seis dos 16 casos ocorreram em laboratoristas; seis outros adquiriram a infecção por contacto com cães infectados; nos 4 casos restantes, a fonte de infecção foi desconhecida. Os casos acima descritos associados ao fato de que as infecções ativas, por Brucella canis em cães, podem persistir por vários meses (WOOLEY e col., ⁸³, 1976) fazem crer que o homem pode, realmente, se infectar com o agente do aborto canino.

Assim sendo, deve-se pensar na possibilidade de infecção humana por Brucella canis em casos de febre e linfadenopatia de etiologias indeterminadas.

5 . CONCLUSÕES .

5. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos através da metodologia empregada permitiram chegar às conclusões descritas a seguir.

- 5.1. A prevalência da infecção nos animais de canil, segundo a prova de SAR, foi igual a 9,1%, ao passo que se observou 2,4% de reagentes segundo a prova de SAL. No atinente aos cães errantes, observou-se uma prevalência de 7,5% de soropositivos, segundo a prova de SAR, e 7% segundo a prova de SAL.
- 5.2. De seis animais reagentes examinados por meio de hemocultura, foram isoladas três amostras de Brucella canis, revelando que 50% dos cães soropositivos apresentavam-se bacterêmicos por ocasião da coleta de sangue.
- 5.3. As aglutininas anti Brucella canis foram detectadas, pela primeira vez, entre o 14º e 35º dias após a inoculação experimental por via oral, enquanto que a hemocultura positiva foi observada, pela primeira vez, 21 a 49 dias após a exposição dos animais ao agente infectante.
- 5.4. Houve uma associação positiva entre reagente para anticorpos anti Brucella canis e hemocultura positiva.
- 5.5. A prevalência da infecção humana por Brucella canis, avaliada através da pesquisa de aglutininas específicas, foi realizada pela primeira vez em São Paulo, encontrando-se resultado igual a 1,21%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.*

1. ALTON, G. G.; JONES, L. M. & PIETZ, D. G. Las técnicas de la laboratorios en la brucelosis. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. (Série de monografias, 55).
2. BARG, L.; GODOY, A. M. & PERES, F. N. Pesquisa de aglutininas anti Brucella canis em soros humanos. Arq. Esc. Vet. U F M G, 29: 31-4, 1977.
3. BLAIR, J. E.; LENNET, E. H. & TRUANT, J. P. Manual of clinical microbiology. American Society of Microbiology. Bethesda, Williams & Williams Co., 1970.
4. BLANKENSHIP, R. M. & SANDFORD, J. P. Brucella canis: a case of undulant fever. Amer. J. Med., 59: 424-6, 1975.
5. BROWN, G. M.; PIETZ, D. E. & RANGER, C. R. Experimental Brucella canis infection in the dog. IN: WORLD VETERINARY CONGRESS, 20th, Thessaloniki, 1975. Proceedings. Thessaloniki, 1975. v. 2, p. 785-6.
6. BROWN, G. M.; PIETZ, D. E. & RANGER, C. R. Serologic and bacteriologic procedures for the diagnosis of Brucella canis. Proc. U.S. anim. Hlth Ass., 77: 532, 1973.
7. BROWN, J.; BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E. & DREESEN, D.W. Brucella canis infectivity rates in stray and pet dogs populations. Amer. J. publ. Hlth, 66: 889-91, 1976.
8. BROWN, J.; BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E.; DREESEN, D. W. & CARMICHAEL, L. E. A serologic survey of a population of Georgia dogs for B. canis and an evaluation of slide agglutination test. J. Amer. vet. med. Ass., 169: 1214-6, 1976.

(*) DE ACORDO COM:

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Referências bibliográficas em ciências biomédicas. São Paulo, 1971.

9. CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. Theriogenology, 6: 105-16, 1976.
10. CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass., 71: 517-27, 1969.
11. CARMICHAEL, L. E. Contagious abortion in beagles. Hounds and Hunting. 64: 14-8, 1967.
12. CARMICHAEL, L. E. & BRUNER, D. W. Characteristics of a newly-recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions. Cornell vet., 58: 579-92, 1968.
13. CARMICHAEL, L. E. & GEORGE, L. W. Canine brucellosis: newer knowledge. International symposium on brucellosis (II), Rabat, 1975. Develop. biol. Stand., 31: 237-50, 1976.
14. CARMICHAEL, L. E. & KENNEY, R. M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. J. Amer. vet. med. Ass., 156: 1726-34, 1970.
15. CARMICHAEL, L. E.; BAROL, S. R.; BROAD, R. H. & FREITAG, J. L. Human infection with the agent of canine abortion. Bol. inf. trimest. Centro Panamer. Zoon., 10: 24-7, 1968.
16. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Brucellosis in the United States, 1965-1974. J. infect. Dis., 136: 312-6, 1977.
17. CLEGG, F. G. Brucella abortus infection in the dog. A case of polyarthritis. Res. vet. Sci., 9: 183-5, 1968.
18. DAMP, S. C.; CRUMRINE, M. H. & LEWIS JR., G. E. Microtiter plate agglutination test for Brucella canis antibodies. Appl. Microbiol., 25: 489-90, 1973.
19. FAIGEL, H. C. Beagle fever-canine brucellosis. Clin. Pediatr., 8: 59, 1969.

20. FLORES-CASTRO, R. & SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. Cornell vet., 66: 347-52, 1976.
21. FREDRICKSON, L. E. & BARTON, C. E. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. J. Amer. vet. med. Ass., 165: 987-9, 1974.
22. FREEMAN, A. Canine brucellosis. J. Amer. vet. med. Ass., 159: 6-7, 1971.
23. GALPHIN JR., S.P. A serologic survey for Brucella canis in dogs on a military base. J. Amer. vet. med. Ass., 171: 728-9, 1977.
24. GEORGE, L. W. & CARMICHAEL, L. E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. Amer. J. vet. Res., 35: 905-9, 1974.
25. GEORGE, L. W. & CARMICHAEL, L. E. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of Brucella canis infection. Cornell vet., 68: 530-43, 1978.
26. GLEISER, C. A.; SHELDON, W. G.; VAN HOOSIER JR., G. L. & HILL, W. A. Pathologic changes in dogs infected with a Brucella organism. Lab. anim. Sci., 21: 540-5, 1971.
27. GODOY, A. M.; PERES, J. N. & BARG, L. Isolamento de Brucella canis em Minas Gerais, Brasil. Arq. Esc. Vet. UFMG, 29: 35-42, 1977.
28. HALL, W. H. Epidemic brucellosis in beagles. J. infect. Dis., 124: 615-8, 1971.
29. HARRIS, A. M.; HORTON, M. L.; LETSCHER, R.M.; Mc CONNELL, E. E. & NEW, A. L. Brucella canis - an occult disease in a research canine colony. Lab. anim. Sci., 24: 796-9, 1974.

30. HAYASHI, T.T. A. & ISAYAMA, Y. Detection of Brucella canis in fection in dogs in Hokkaido. Microbiol. Immunol., 21: 295-8, 1977.
31. HENDERSON, R. A.; HORLEIN, B. F.; KRAMER, T. T. & MEYER, M.E. Discospondylitis in three dogs infected with Brucella canis. J. Amer. vet. med. Ass., 165: 451-5, 1974.
32. HILL, W. A.; VAN HOOSIER JR., G. L. & McCORMICK, N. Enzootic abortion in a canine production colony I. Epizootiology, clinical features and control procedures ^{1, 2, 3}. Lab. anim. Care, 20: 205-8, 1970.
33. HOFF, G. L. & NICHOLS, J. B. Canine brucellosis in Florida: serologic survey of pounds dogs, animal shelter workers and veterinarians. Amer. J. Epidem., 100: 35-9, 1974.
34. HOFF, G. L. & SCHNEIDER, N. J. Serologic survey for agglutinins to Brucella canis in Florida residents. Amer. J. trop. Med. Hyg., 24: 157-9, 1975.
35. JENNINGS, P. B.; CRUMRINE, M. H.; LEWIS JR., G. E. & FARISS, B. L. The effect of a two-stage antibiotic regimen on dogs infected with Brucella canis. J. Amer. vet. med. Ass., 164: 513-4, 1974.
36. KIMBERLING, C. V.; LUCHSINGER, D. W. & ANDERSON, R. K. Three cases of canine brucellosis. J. Amer. vet. med. Ass., 148: 900-1, 1966.
37. LEWIS JR., G. E. A serological survey of 650 dogs to detect titers for B. canis (B. suis, type 5). J. Amer. anim. Hosp. Ass., 8: 102-7, 1972.
38. LEWIS JR., G. E. & ANDERSON, J. K. The incidence of Brucella canis antibodies in sera of military recruits. Amer. J. publ. Hlth, 63: 204-5, 1973.

39. LEWIS JR., G. E.; CRUMRINE, M. H.; JENNINGS, P. B. & FARISS, B.L. Therapeutic value of tetracycline and ampicillin in dogs infected with Brucella canis. J. Amer. vet. med.Ass., 163: 239-41, 1973.
40. LOVEJOY, G. S.; CARVER, H. D.; MOSELEY, I. K. & HICHS, M. Sero survey of dogs for Brucella canis infection in Memphis, Tennessee. Amer. J. publ. Hlth, 66: 175-6, 1976.
41. MARASCUILLO, L. A. Statistical methods for behavioral science research. New York, McGraw Hill, 1971.
42. McCORMICK, N.; HILL, W. A.; VAN HOOSIER JR. G.L. & WENDE, R. Enzootic abortion in a canine production colony. II. Characteristics of the associated organism, evidence for its classification as B. canis, and antibody studies on exposed humans. Lab. anim. Care, 20: 209-14, 1970.
43. MEYER, M. E. Advances in research on brucellosis, 1957-1972. Adv. vet. Sci. comp. Med., 18: 231-50, 1974.
44. MOORE, J. A. Brucella canis infection in dogs. J. Amer. vet. med. Ass., 155: 2034-7, 1969.
45. MOORE, J. A. & BENNETT, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion. Vet. Rec., 80: 604-5, 1967.
46. MOORE, J. A. & GUPTA, B. N. Epizootiology, diagnosis, and control of Brucella canis. J. Amer. vet. med. Ass., 156: 1737-40, 1970.
47. MOORE, J. A. & KAKUK, T. J. Male dogs naturally infected with Brucella canis. J. Amer. vet. med. Ass., 155: 1352-8, 1969.
48. MUNFORD, R. S.; WEAVER, R. E.; PATTON, C.; FEELEY, J. C. & FELDMAN, R. A. Human disease caused by Brucella canis. A clinical and epidemiologic study of two cases. J. Amer. med. Ass., 231: 1267-9, 1975.

49. 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. Appl. Microbiol., 28: 1-4, 1974.
50. NICHOLLETTI, P. L.; QUINN, B. R. & MINOR, P. W. Canine to human transmission of brucellosis. N.Y. St. J. Med., 67: 2886-7, 1967.
51. PERCY, D. H.; EGWU, I. N. & JONAS, A. M. Experimental Brucella canis infection in the monkey (Macaca arctoides). Canad. J. comp. Med., 36: 221-5, 1972.
52. PEREIRA FILHO, M.; SILVA, J. A. H. da & ROCHA, J. V. N. da. Estudo da incidência da brucelose canina na zona metropolitana de Salvador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Salvador, 1978. Anais. Salvador, BA., 1978.p.32.
53. PHILLIPON, A.; ROUMY, B. & RENOUX, G. Un cas de brucellose canine à Brucella abortus. Bull. Acad. vét. France, 42: 923-8, 1969.
54. PICKERILL, P. A. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. J. Amer. vet. med. Ass., 156: 1741-2, 1970.
55. PICKERILL, P. A. & CARMPCHAEAL, L. E. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. J. Amer. vet. med. Ass., 160: 1607-15, 1972.
56. RIECKE, J. A. & RHOADES, H. E. Brucella canis isolated from the eye of a dog. J. Amer. vet. med. Ass., 166: 583-4, 1975.
57. ROBERTSON, M. G. Brucella infection transmitted by dog bite. J. Amer. med. Ass., 225: 750-1, 1973.
58. SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y. & FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. Jap. J. vet. Sci., 39: 181-5, 1977.

59. 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. Biológico, 42: 128-32, 1976.
60. SCHOEB, T. R. & MORTON, R. M. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. J. Amer. vet. med. Ass., 172: 598-600, 1978.
61. ŠEBEK, Z.; ŠÝKORA, I.; HOLDA, J. & KOMÁREK, J. Sérologický průkaz Brucella canis v chovu laboratorních psů plemene beagle v Československu. Čs. Epidem., 25: 129-36, 1976.
62. SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. & NAKAO, N. Significance of urine culture for detecting infection with Brucella canis in dogs. Jap. J. vet. Sci., 40: 353-5, 1978.
63. SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. & NAKAO, N. A survey of dogs from Gifu and Shiga area for Brucella canis. Jap. J. vet. Sci., 39: 635-42, 1977.
64. SPINK, W. W. Comments on canine brucellosis due to Brucella canis. J. Amer. vet. med. Ass., 156: 1734-6, 1970.
65. SPINK, W. W. & MORISSET, R. Epidemic canine brucellosis due to a new species: B. canis. Trans. Amer. clin. Climatol. Ass., 81: 43-50, 1970.
66. SWENSON, R. M.; CARMICHAEL, L. E. & CUNDY, K. R. Human infection with Brucella canis. Ann. intern. Med., 76: 435-8, 1972.
67. SYMPOSIUM ON IMMUNITY TO SELECTED CANINE INFECTIOUS DISEASES, New York, 1969. Report of the panel. J. Amer. vet. med. Ass., 156: 1661-8, 1970.
68. TAUL, L. K.; POWELL, H. S. & BAKER, O. E. Canine abortion due to an unclassified Gram-negative bacterium. Vet. Med. small Anim. Clin., 62: 543-4, 1967.

69. TERAKADO, N.; UEDA, H.; SUGAWARA, H.; ISAYAMA, Y. & KOYAMA, N.
Drug susceptibility of Brucella canis isolated from dogs.
Jap. J. vet. Sci., 40: 291-5, 1978.
70. UEDA, K.; MAGARIBUCHI, T.; SAEGUSA, J.; URANO, I.; ITOH, K.;
KIUCHI, Y. & FUJIWARA, K. Spontaneous Brucella canis in
infection in beagles: bacteriological and serological stu
dies. Jap. J. vet. Sci., 36: 381-9, 1974.
71. UEDA, K.; SAEGUSA, J.; FUJIWARA, K.; MUTO, S.; OKADA, K.; HA
SEGAWA, A.; SAEGUSA, S. & USUI, K. Detection of Brucella
canis infection in dogs from Tokyo area. Jap. J. vet. Sci.
36: 539-42, 1974.
72. VAN HOOSIER JR., G. L.; McCORMICK, N. & HILL, W. A. Enzootic
abortion in a canine colony. III. Bacteremia, antibody res
ponse and mercaptoethanol sensitivity of agglutinins in na
turally infected dogs^{1,2,3}. Lab. anim. Care., 20: 964-8.
1970.
73. VERGER, J. M.; GÂTÉ, M.; PIÉCHAUD, M.; CHATELAIN, R.; RAMISSE,
J. & BLANCOU, J. Isolement de Brucella suis biotype 5 à
Madagascar chez une chienne. Validité du nom d'espèce Bru
cella canis. Ann. Microbiol., Paris, 126 (A): 57-74, 1975.
74. VON KRUEDENER, R. B. Isolierung und Bestimmung von Brucella
canis aus einem Beaglebestand. Zbl. Vet.-Med., 21 B: 307-
-10, 1974.
75. VON KRUEDENER, R. B. Outbreak of a Brucella canis infection in
a beagle colony in West Germany. International symposium on
brucellosis (II), Rabat, 1975. Develop. biol. Stand., 31:
251-3, 1976.
76. WEBER, A. [Distribution of Brucella canis infection in bea
gles in the German Federal Republic]. Fortsch. Vet. Med.,
25: 272-8, 1976 apud Vet. Bull., 46: 6388, 1976.

77. WEBER, A. & BRUNER, H. Seroepidemiologisch untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen Brucella canis beim Menschen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 238: 237-43, 1977.
78. WEBER, A. & HUSSEIN, N. A. Der indirekte Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Brucella canis Infektionen bei Beagle-Hunden. Zbl. Vet.-Med., 23 B: 151-7, 1976.
79. WEBER, A. & KRAUSS, H. Über die Branchbarkeit des Agargel Präzipitationstestes zum Nachweis von Brucella canis - Infektionen bei Beagle - Hunden. Berl. Munch. tierärztl. Wschr., 88: 425-7, 1975.
80. WEBER, A. & SCHLIESSER, T. Serologischer und kultureller Nachweis von Brucella canis bei Beagle - Hunden einer Versuchstierhaltung. Zbl. Vet.-Med., 22 B: 403-10, 1975.
81. WEBER, A. & SCHLIESSER, T. Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen Brucella canis bei Haushunden in der Bundesrepublik Deutschland. Berl. Munch. tierärztl. Wschr., 91: 28-30, 1978.
82. WEBER, A. & SCHULZ, H. P. Über den Nachweis von Brucella canis bei Beagle - Hunden. Kleintierpraxis, 21: 23-8, 1976.
83. WOOLEY, R. E.; BROWN, J. & BLUE, J. L. Canine Brucellosis in man. Mod. vet. Pract., 57: 287-90, 1976.
84. WOOLEY, R. E.; BROWN, J.; SHOTTS, E. B.; BLUE, J. L. & DRESEN, D. W. Serosurvey of Brucella canis antibodies in urban and rural stray dogs in Georgia. Vet. Med. small Anim. Clin., 72: 1581-4, 1977.
85. YAMAUCHI, C.; SUZUKI, T. & NOMURA, T. Canine brucellosis in a beagle breeding colony. Jap. J. vet. Sci., 36: 175-82, 1974.