

MARIA CRYSKELY AGRA BATINGA

Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP)

Pirassununga
2017

MARIA CRYSKELY AGRA BATINGA

Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP)

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Lara Borges Keid

De acordo:


Orientador

Pirassununga
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3461
FMVZ

Batinga, Maria Cryskely Agra

Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP). / Maria Cryskely Agra Batinga. -- 2017.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Lara Borges Keid.

1. *Brucella canis*. 2. Cães. 3. Hemocultura. 4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR). 5. Amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP). I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por loop (LAMP)", protocolado sob o CEUA nº 9290230216, sob a responsabilidade de **Lara Borges Keid e equipe; Maria Cryskely Agra Batinga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 23/03/2016.

We certify that the proposal "Comparative diagnosis of canine brucellosis using the polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP)", utilizing 120 Dogs (males and females), protocol number CEUA 9290230216, under the responsibility of **Lara Borges Keid and team; Maria Cryskely Agra Batinga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 03/23/2016.

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 02/2017

Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Procedência: Animais de proprietários

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 2 a 180 365

N: 120

Linhagem: qualquer

Peso: 50 a 50

Resumo: A *Brucella canis* é a responsável pela brucelose nos cães e pode ser transmitida para os seres humanos através do contato direto com os cães ou em acidentes ocupacionais, ocasionalmente resulta em doença grave e complicações severas, com considerável impacto na saúde pública. A brucelose canina desencadeia inúmeras perdas econômicas em canis comerciais, pela permanência de animais infectados e assintomáticos, ocorrência de abortos, morte embrionária, natimortos e nascimento de filhotes debilitados. O diagnóstico sorológico é rotineiramente realizado pelas provas de soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta (SAL), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), soroaglutinação rápida com 2-mecaptoetanol (2ME-SAR), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos. O isolamento da *Brucella canis* pelo método de hemocultura é altamente indicado pela precisão em diagnosticar animais positivos devido ao longo período de bacteremia realizado por essas cepas bacterianas. A amplificação dos ácidos nucléicos pela reação em cadeia pela polimerase é uma importante ferramenta de diagnóstico direto amplamente difundida no diagnóstico de doenças infecciosas, tal como a brucelose, pela alta especificidade e sensibilidade do teste. Contudo, apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, o alto gasto com materiais, equipamentos e infraestrutura. Um novo método de diagnóstico molecular baseado na amplificação isotérmica do DNA mediada por loop (LAMP) amplifica sequências de DNA em um curto período de tempo, com o uso de apenas um tipo de enzima, em temperatura constante e num período de tempo muito curto. Essa nova técnica amplifica o material genético com maior eficiência e alta especificidade, trata-se de um teste de fácil execução, que combina rapidez, simplicidade e precisão. O método de LAMP já foi utilizado para identificação de *Brucella* spp. baseado na região IS711 em amostras clínicas de sangue total e os resultados obtidos indicaram níveis adequados de sensibilidade para propósitos de diagnóstico. O projeto avaliará comparativamente a potencialidade de diagnóstico dos testes moleculares de PCR convencional e LAMP baseados na região gênica IS711, em amostras de sangue total oriundas de 120 cães com problemas reprodutivos pertencentes a canis comerciais do estado de São Paulo.

São Paulo, 23 de março de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Batinga, Maria Cryskey Agra

Título: Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP)

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

Data: __/__/__

BANCA EXANIMADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu imenso Amor e pela fé que me deu forças para não desistir nos momentos de adversidade.

Aos meus amados pais e toda a minha família, pela motivação, pelo carinho e por sempre me incentivarem a ser forte diante das dificuldades. Agradeço ainda, pelo simples fato de acreditarem que os meus sonhos se tornariam realidade e isso me fortalecia todos os dias.

A professora Doutora Lara Borges Keid, minha orientadora, pela proposta do mestrado e por ter me confiado este projeto, pela paciência ao ensinar, por ter compartilhado suas ideias e pelos tantos momentos de aprendizado, que foram de fundamental importância para a minha formação acadêmica.

A todos os professores da pós graduação, pelo conhecimento transmitido durante as disciplinas ministradas, no Programa de Aperfeiçoamento do Ensino e nas conversas informais ao compartilhar suas ideias e me ajudar na tomada de decisões.

Aos colegas da FMVZ-USP e da FZEA-USP, que compartilharam comigo tantos momentos felizes e também estavam presentes nos momentos difíceis, sempre com uma palavra amiga e bons conselhos, que foram de fundamental importância nesse momento da minha vida.

E a todos que de algum modo, ainda que não diretamente contribuíram para a concretização desse projeto de mestrado.

RESUMO

Batinga, M. C. A. **Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP)**. [Comparative molecular diagnosis of canine brucellosis by application of polymerase chain reaction (PCR) techniques and loop-mediated isothermal amplification (LAMP)]. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2017.

A *Brucella canis* é a bactéria responsável pela brucelose nos cães, pode ser transmitida para os seres humanos, ocasionalmente resultando em doença grave, com impacto na saúde pública. A brucelose canina desencadeia inúmeras perdas econômicas em canis comerciais, com a ocorrência de abortamentos, morte embrionária, natimortos e nascimento de filhotes debilitados. O diagnóstico sorológico é rotineiramente realizado, contudo a hemocultura é o teste “padrão-ouro”. A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) pode ser aplicada no diagnóstico direto como alternativa à hemocultura, pela rapidez, alta especificidade e sensibilidade do teste, mas apresenta alto custo com infraestrutura e equipamentos. A amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) constitui outra alternativa para amplificação do DNA em um curto período de tempo, com simplicidade e menor custo. O projeto avaliou comparativamente o desempenho dos testes moleculares de PCR e LAMP com *primers* direcionados à sequência de inserção *IS711* de *Brucella* spp. em 98 amostras de sangue total, obtidas de 57 cães. Os 57 cães foram divididos em três grupos: infectados por *B. canis* (cães positivos na hemocultura) não infectados por *B. canis* (negativos na hemocultura e sem evidências clínicas e epidemiológicas de brucelose) e suspeitos de brucelose (cães negativos na hemocultura, mas com suspeita clínica e/ou epidemiológica da infecção). A sensibilidade e especificidade diagnóstica das reações de LAMP e PCR foram calculadas, utilizando-se os grupos de cães infectados e não infectados, respectivamente. O desempenho dos testes foi analisado, utilizando-se as 98 amostras, comparadas duas a duas, pelos testes estatísticos de Coeficiente Kappa e McNemar. A proporção de amostras positivas foi de 43,87% (43/98) na hemocultura, 46,93% (46/98) na PCR e 16,33% (16/98) na LAMP. A concordância entre a hemocultura e a PCR foi ótima, enquanto que a concordância entre a LAMP e a hemocultura e entre a LAMP e a PCR foi sofrível. A sensibilidade diagnóstica foi de 100% (18/18) na PCR e 44,44% (8/18) na LAMP, enquanto que a especificidade diagnóstica foi de 96% (20/21) na PCR e 100% (21/21) na LAMP. O desempenho da reação de LAMP foi insatisfatório para o diagnóstico da brucelose nos cães, em razão dos baixos valores de sensibilidade do teste. A PCR, por outro lado, apresentou desempenho similar à hemocultura, o que a torna uma alternativa para uso no diagnóstico da brucelose canina.

Palavras-chave: *Brucella canis*. Cães. Hemocultura. Reação em cadeia pela polimerase. Amplificação isotérmica mediada por loop.

ABSTRACT

Batinga, M. C. A. **Comparative molecular diagnosis of canine brucellosis by application of polymerase chain reaction (PCR) techniques and loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**. [Diagnóstico molecular comparativo da brucelose canina pela aplicação das técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP)]. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2017.

Brucella canis is the etiological agent responsible for brucellosis in dogs and can be transmitted to human beings, occasionally resulting in severe disease, and leading to impacts on public health. Canine brucellosis triggers numerous economic losses in commercial kennels, causing abortions, embryonic death, stillbirths and birth of debilitated puppies. Serological diagnosis is routinely performed, but blood culture is the *gold standard* test. Polymerase chain reaction (PCR) can be used to the direct diagnosis of infection in view of its speed and high specificity and sensitivity values, however it has high cost because of the laboratory infrastructure and equipments needed. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) may be an alternative to DNA amplification in a shorter period of time, with simplicity and low cost. This project evaluated the potential of the molecular tests of PCR and LAMP using primers targeting the insertion sequence IS711 of *Brucella*, using 98 whole blood samples of 57 dogs. The 57 dogs were divided into three groups: infected by *B. canis* (dogs with positive results in blood culture), non-infected by *B. canis* (dogs with negative results by blood culture and showing no clinical or epidemiological evidences of brucellosis) and dogs suspected of brucellosis (those with negative blood culture but with clinical and/or epidemiological evidences of infection). The diagnostic sensitivity and specificity of PCR and LAMP were calculated using the infected and non-infected groups, respectively. The performance of the three diagnostic tests was pair compared using the 98 samples using McNemar test and Kappa coefficient. The proportion of positive samples detected by blood culture, PCR and LAMP was respectively 43.87% (43/98), 46.93% (46/98), and 16.33% (16/98). The concordance between blood culture and PCR was almost perfect, while the concordance between LAMP and blood culture and between LAMP and PCR was fair. The diagnostic sensitivity of PCR and LAMP was, respectively, 100% (18/18) and 44.44% (8/18), while the diagnostic specificity of the tests was 96% (20/21) and 100% (21/21), respectively. LAMP performance was not satisfactory for canine brucellosis diagnosis because of the low sensitivity of the test. PCR showed similar performance when compared to blood culture, which makes it a good alternative for use for the diagnosis of canine brucellosis.

Keywords: *Brucella canis*. Dogs. Blood culture. Polymerase chain reaction. Loop-mediated isothermal amplification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Parede celular e estruturas adjacentes de bactérias Gram negativas24
- Figura 2 - Resultado da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), com *primers IS711*, aplicada em amostras de DNA obtidas de sangue canino para diagnóstico de brucelose46
- Figura 3 - Resultado da técnica da amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP), com *primers IS711*, aplicada em amostras de DNA obtidas de sangue canino para diagnóstico de brucelose47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Ocorrência da brucelose canina no Brasil	18
Quadro 2 -	Cepas bacterianas utilizadas no estudo	36
Quadro 3 -	Sequência de <i>primers IS711</i> desenhados para as reações de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por <i>loop</i> (LAMP) para detecção de <i>Brucella</i> spp.	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Desempenho das técnicas de hemocultura, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP), aplicadas em amostras de DNA obtidas de sangue total canino para diagnóstico de brucelose causada por *Brucella canis*, comparadas duas a duas pelos testes estatísticos de Kappa e McNemar (intervalo de confiança de 5%)48
- Tabela 2 - Resultados das técnicas de hemocultura, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP) para diagnóstico da brucelose canina73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3	OBJETIVOS	34
3.1	GERAIS	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ANIMAIS E AMOSTRAS.....	34
4.2	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	35
4.3	HEMOCULTURA	37
4.4	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	38
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA DAS COLÔNIAS BACTERIANAS	39
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE TOTAL CANINO	40
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE DNA E PREPARO DAS DILUIÇÕES SERIADAS	41
4.8	AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA PCR E LAMP	42
4.9	VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	44
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	44
5	RESULTADOS	45
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A brucelose canina transmitida pela *Brucella canis* é uma zoonose de considerável importância, principalmente para os cães que são criados em canis comerciais e constantemente utilizados para fins reprodutivos, uma vez que essa atividade estimula a propagação da doença em todo o plantel. Ademais, a ocorrência da brucelose canina em um canil comercial gera um grande impacto econômico, em consequência das perdas econômicas com cães inférteis, abortamentos, natimortos, filhotes debilitados entre outros sinais clínicos.

O caráter zoonótico dessa enfermidade é um fator de relevância para a saúde pública, uma vez que pode ser transmitida para os seres humanos em contato direto com os animais infectados. Seres humanos acometidos, podem desencadear infecções de caráter crônico e persistente, que podem ser assintomáticas ou manifestarem-se na forma de graves doenças sistêmicas. Atualmente, a incidência da infecção na população humana é desconhecida em razão da ausência de notificação.

A enfermidade é considerada endêmica no Brasil e, apesar de seu caráter zoonótico e da alta frequência de ocorrência verificada em diversas populações caninas, não há regulamentação para o controle da infecção, não sendo uma enfermidade de notificação obrigatória. Nos cães, a enfermidade é crônica e persistente, não há vacina para sua prevenção e o tratamento antibiótico dos cães acometidos é pouco eficiente em eliminar o estado de portador do animal. Assim, o diagnóstico laboratorial é fundamental para a identificação dos cães acometidos e sua segregação, na tentativa de se reduzir a transmissão da infecção na população.

Atualmente, o isolamento da *B. canis* pela hemocultura é considerado o teste “padrão-ouro” para o diagnóstico da brucelose canina pela alta sensibilidade desse teste. O sangue total é a amostra de eleição devido à bacteremia prolongada, característica desta infecção. Contudo, a hemocultura apresenta algumas desvantagens, como a demora de execução, a possibilidade de contaminação do meio de cultivo e o alto risco de transmissão para laboratoristas. Os testes sorológicos são rotineiramente aplicados no diagnóstico da brucelose canina, contudo devem ser utilizados em paralelo, com testes diretos de diagnóstico, devido à ocorrência de resultados falso-negativos.

Diversos estudos enfatizam a eficiência dos testes moleculares na detecção de infecções por *B. canis*, pela rapidez de execução dos testes e pela alta sensibilidade e especificidade diagnóstica. Contudo, a técnica molecular de reação em cadeia pela polimerase (PCR) apresenta as desvantagens do alto custo devido à necessidade de infraestrutura e equipamentos adequados. A amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP) é um teste molecular rápido, simples e de menor custo, todavia não há estudos que comprovem a eficiência deste teste no diagnóstico da brucelose canina.

O desenvolvimento de um teste diagnóstico de rápida execução, baixo custo e que identifique corretamente os animais infectados seria uma importante ferramenta de prevenção da disseminação da enfermidade entre os animais e destes para os seres humanos e é de extrema valia devido ao atual cenário epidemiológico da brucelose canina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é considerada uma zoonose endêmica presente em diversas regiões do mundo, que acomete seres humanos, animais domésticos e silvestres, sendo responsável por inúmeros casos de doença e morte na população humana (ABDUSSALAM; FEIN, 1976; PAPPAS et al., 2006; SELEEN et al., 2010; McDERMOTT et al., 2013). Na listagem de doenças de notificação obrigatória da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) a brucelose está incluída como uma enfermidade comum a várias espécies animais destinadas à produção agropecuária (OIE, 2012). Em um estudo realizado em 2012 pelo *International Livestock Research Institute* verificou-se que 56 zoonoses são responsáveis pela morte de 2,7 milhões de pessoas por ano e a brucelose foi classificada como a sétima mais importante zoonose em países pobres, devido ao grande impacto na saúde pública e no setor pecuário (ILRI, 2012). Assim devido a considerável influência na sanidade animal e saúde pública, vários países implantaram estratégias de controle e erradicação da brucelose na população animal destinada à produção (POESTER et al., 2009).

Pertencente à família Brucellaceae, o gênero *Brucella* é composto por pequenas bactérias com formato de cocobacilos, tamanho entre 0,5 a 2,0 micrômetros, pleomórficas, Gram-negativas, não formadoras de esporos e não flageladas. Normalmente estão dispostas isoladamente, sendo menos frequente a organização em pares ou grupos. As espécies do gênero diferem entre si quanto às propriedades antigênicas e de patogenicidade e estão divididas em dois grupos antigênicos distintos: lisas e rugosas (CORBEL; BANAI, 2005).

Classicamente, o gênero *Brucella* compreende seis espécies, sendo que cada uma acomete preferencialmente uma espécie de hospedeiro mamífero (ALTON et al., 1976; CORBEL; BANAI, 2005). A *B. melitensis*, é dividida em três biovares e é responsável pela brucelose nos caprinos e ovinos; a *B. abortus*, é dividida em oito biovares e causa a brucelose nos bovinos e bubalinos (MEYER; SHAW, 1920); a *B. suis* possui cinco biovares, sendo que os biovares 1 e 3 são responsáveis pela infecção nos suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) e também nos selvagens (*Sus scrofa scrofa*), o biovar 2 acomete suídeos selvagens e tem sido verificado causando infecções na lebre européia (*Lepus capensis*). O biovar 4 de *B. suis* tem as renas e caribus (*Rangifer tarandus* e subespécies) como hospedeiros e o biovar 5 foi isolado de roedores silvestres (TRAUM, 1914; CORBEL, 1997). As espécies *B. ovis* e *B. canis* não são classificadas em biovares e são responsáveis por causar,

respectivamente, a epididimite nos ovinos e a brucelose nos cães (BUDDLE, 1956; CARMICHAEL; BRUNER, 1968). A *B. neotomae* também não é classificada em biovars e foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida* nos Estados Unidos (STOENNER; LACKMAN, 1957; MOORE; BENNETT, 1967).

Além das seis espécies clássicas, novas espécies foram descritas neste gênero recentemente: *B. ceti* e *B. pinnipedialis* foram identificadas em mamíferos marinhos cetáceos e pinípedes, respectivamente (FOSTER et al., 2007) *B. microti* foi isolada do roedor *Microtus arvalis* na República Tcheca e também de raposas da espécie *Vulpes vulpes* e de amostras de solo na Europa (SCHOLZ et al., 2008a, 2008b, 2009); *B. inopinata* foi isolada de implante mamário em um paciente humano, sendo que o reservatório animal desta espécie ainda não conhecido (SCHOLZ et al., 2010); a espécie *B. papionis* foi identificada como causadora de problemas reprodutivos em primatas babuínos (*Papio* sp.) nos Estados Unidos (WHATMORE et al., 2014); e *B. vulpis* tem como reservatório a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), sendo identificada na Áustria (SCHOLZ et al., 2016a). Mais recentemente, cepas de *Brucella* foram isoladas de várias espécies de anfíbios provenientes da Europa, África, Ásia, América do Sul, Central e Oceania, sendo associadas a quadros patológicos localizados ou disseminados em diversas espécies de anfíbios, indicando que estes possam representar novos hospedeiros de organismos do gênero *Brucella* (SCHOLZ et al., 2016b).

A *B. canis* foi isolada primeiramente por Carmichael em 1966 nos tecidos fetais e placentários de cães da raça Beagle com falhas de concepção e abortamento. Desde a sua descoberta, essa bactéria tem sido relatada como a grande causadora de perdas econômicas em canis comerciais (MOORE; BENNETT, 1967; CARMICHAEL, 1966; DIAZ et al., 1968; JONES et al., 1968; WANKE, 2004; HOLLET, 2006; BRENNAN et al., 2008; LÓPEZ et al., 2009; MOSALLANEJAD et al., 2009; GYURANECZ et al., 2011; HOLST et al., 2012).

A ocorrência da brucelose em cães já foi relatada em várias regiões do mundo, incluindo países do continente americano, africano e asiático, contudo a Austrália e Nova Zelândia aparentemente estão livres do patógeno (UEDA et al., 1974b; WANKE, 2004; LEDBETTER et al., 2009; LÓPEZ et al., 2009; MOSALLANEJAD et al., 2009; CORRENTE et al., 2010; GYURANECZ et al., 2011; CSFPH, 2012). De acordo com López et al. (2009) não há como estimar a prevalência global da brucelose em cães e pouco esforço tem sido feito para o controle da doença, exceto algumas iniciativas particulares direcionadas a determinadas raças de cães e em canis comerciais. No Brasil, a ocorrência da brucelose canina

foi mensurada através de estudos soropidemiológicos, microbiológicos e moleculares em diversas localidades do país e de acordo com os dados obtidos a frequência da *B. canis* variou de 0,3% a 54,77%, conforme verificado no quadro 1 (CARVALHO et al., 2000; ALVES et al., 2003; AZEVEDO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; KEID et al., 2004; AGUIAR et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006; FERREIRA, et al., 2007; MALEK dos REIS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; DORNELES et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; SILVA et al., 2012; DREER et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; MACHADO et al., 2013; SANTANA et al., 2013; PAZ et al., 2015; MASCOLLI et al., 2016).

Quadro 1 – Ocorrência da brucelose canina no Brasil

(continua)

LOCALIDADE	PROCEDÊNCIA DOS CÃES	NÚMERO DE CÃES	TESTE	OCORRÊNCIA	FONTE
Belém – PA	Abrigos	236	IDGA	45,34%	Carvalho et al., 2000.
Patos – PB	Zona rural, Hovet	274	IDGA	3,6%	Alves et al., 2003.
Santana do Parnaíba – SP	Campanha anti-rábica	410	IDGA	9,51%	Azevedo et al., 2003.
Alfenas – MG	Campanha anti-rábica	635	IDGA	14,2%	Almeida et al., 2004.
Estado de São Paulo	Canil comercial	171	IDGA	33,91%	Keid et al., 2004.
Monte Negro – RO	Rural e urbana	304	IDGA	0,3%	Aguiar et al., 2005.
Salvador – BA	Urbana	85	IDGA	5,88%	Cavalcanti et al., 2006.
Rio de Janeiro – RJ	Urbana	316	IDGA	2,53%	Ferreira et al., 2007.
Salvador – BA	Urbana	85	IDGA	5,88%	Malek dos Reis et al., 2008.
Campina Grande – PB	Campanha anti-rábica	170	IDGA	2,35%	Vasconcellos et al., 2008.
Araguaína - TO	Campanha anti-rábica	374	IDGA	44,53%	Dorneles et al., 2011.
Patos – PB	Hovet	193	IDGA	3,11%	Fernandes et al., 2011.

(conclusão)

LOCALIDADE	PROCEDÊNCIA DOS CÃES	NÚMERO DE CÃES	TESTE	OCORRÊNCIA	FONTE
Cuiabá – MT	Urbana	327	PCR	24,1%	Silva et al., 2012.
Umuarama – PR	Abrigos	175	IDGA	2,85%	Dreer et al., 2013.
Natal – RN	Clínica	416	IDGA	28,9%	Fernandes et al., 2013.
Londrina – PR	Hovet	22	IDGA	4,54%	Machado et al., 2013.
Araguaína – TO	Domiciliados	241	IDGA	54,77%	Santana et al., 2013.
Belém/Castanhal – PA	Urbana	156	IDGA	1,56%	Paz et al., 2015.
Ibiuná – SP	Domiciliados	570	Cultivo microbiológico	1,05%	Mascolli et al., 2016.

IDGA: Imunodifusão em gel de ágar

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

Hovet: Hospital veterinário

A *B. canis* tem o cão como hospedeiro preferencial, contudo possui a capacidade de infectar os seres humanos e a transmissão está relacionada com o contato direto com os cães infectados ou através dos acidentes ocupacionais em laboratórios (WALLACH et al., 2004; LUCERO et al., 2010a). A sintomatologia clínica nos seres humanos manifesta-se principalmente por febre, cansaço, intensa sudorese, linfadenomegalia e perda de peso. Embora a maioria dos casos apresentem sintomas brandos, a infecção por *B. canis* nos humanos pode ocasionalmente resultar em doença grave e complicações severas podendo comprometer os sistemas respiratório, digestivo, neurológico, circulatório e osteoarticular (SPINK; MORISSET; 1970; BLANKENSHIP; SANFORD, 1975; MUNDFORD et al., 1975; ROXO et al., 1990; AZEVEDO et al., 2003; LUCERO et al., 2005b; CORBEL et al., 2006; DENTINGER et al., 2012; KRUEGER et al., 2014).

Em razão do reduzido número de casos reportados na população humana, foi proposto que as bactérias apresentam uma virulência menor quando comparada com as clássicas espécies *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*. No entanto, esse pode ser um grande equívoco,

pois nas últimas décadas tem havido um aumento dos casos de infecções por *B. canis* descritas em seres humanos (SWENSON; CARMICHAEL; CUNDY, 1972; POLT et al., 1982; TOSI; NELSON, 1982; RUMLEY; CHAPMAN, 1986; ROXO et al., 1990; YING; NGUYEN; JAHRE, 1999; PIAMPIANO et al., 2000; SOLOAGA et al., 2004; WALLACH et al., 2004; LUCERO et al., 2005a; LUCERO et al., 2005b; LUCERO et al., 2010a; LUCERO et al., 2010b; NOMURA et al., 2010; LAWACZECK et al., 2011; SAYAN et al., 2011; DENTINGER et al., 2012; NASPHV, 2012; MANIAS et al., 2013; MARZETTI et al., 2013; KRUEGER et al., 2014; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015). Considera-se que a ocorrência é subnotificada devido à deficiência de testes de diagnóstico padronizados para a detecção nos seres humanos. Além disso, a enfermidade raramente é considerada uma suspeita a ser investigada, desse modo é provável que a infecção seja muito mais frequente do que reportado nos estudos epidemiológicos (LUCERO et al., 2005a).

Na epidemiologia da brucelose canina, fetos, placenta, leite materno, fluidos fetais, urina, secreções vaginais e seminais são vias de eliminação da *B. canis* no hospedeiro infectado. A transmissão pode ocorrer por contato oronasal ou genital com estas secreções, havendo a penetração das bactérias pelas membranas mucosas. A urina e o sêmen dos machos, bem como as secreções vaginais das fêmeas, especialmente no período pós-abortamento ou pós-parto, são as principais vias de eliminação da *B. canis*. Por conter uma grande quantidade de bactérias essas secreções genitais são relevantes na transmissão, principalmente pelo contato oronasal. Após a infecção, altas concentrações de brucelas podem ser eliminadas durante semanas ou meses e intermitentemente, em pequenas quantidades durante vários anos (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; MOORE; KAKUK, 1969; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; KEID et al., 2007a,b).

Depois de adentrar o organismo dos cães pelas principais vias de acesso, as brucelas são fagocitadas por macrófagos e outras células fagocíticas, depois são encaminhadas para os órgãos linfáticos (gânglios linfáticos e baço) onde irão iniciar o processo de replicação. Em seguida, inicia-se o período de bacteremia entre uma a quatro semanas após a infecção e persiste por seis meses em média, podendo porém, prolongar-se de maneira intermitente ou não, por vários anos. Quando atingem os órgãos-alvo durante a bacteremia, produzem as alterações patológicas características da doença (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; LARSSON et al., 1984; WANKE, 2004; HOLLETT, 2006; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015).

Tecidos linfóides como baço, linfonodos e fígado constituem os sítios de eleição para replicação bacteriana, que ocorre no interior de macrófagos, contudo a bactéria também pode se replicar em outros sítios, como a próstata, os testículos e epidídimo nos machos e, nas fêmeas reprodutoras, o útero gravídico, a placenta e o feto. Outras regiões do organismo são afetadas, como os discos intervertebrais, os rins e a região anterior da úvea dos olhos (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; KERWIN et al., 1992; LEDBETTER et al., 2009; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015; HOLLET, 2006).

As manifestações clínicas da brucelose estão correlacionadas com as disfunções reprodutivas, como a ocorrência de abortamentos, morte embrionária, reabsorção fetal, nascimento de filhotes debilitados e infertilidade. O abortamento entre 45 e 59 dias de gestação é o sinal clínico característico da brucelose canina, acompanhado por corrimento vaginal viscoso, acastanhado ou verde-cinza, com duração de uma a seis semanas. Após um episódio de abortamento, 85% das fêmeas apresentam ninhadas subsequentes normais (CARMICHAEL, 1966; CARMICHAEL; KENNEY, 1968; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; KEID et al., 2007a,b; BRENNAN et al., 2008; GYURANECZ et al., 2011; HOFER, et al., 2012; HOLST et al., 2012; CHACÓN-DÍAZ et al., 2015).

Os fetos abortados geralmente encontram-se autolisados, com edema subcutâneo, congestão e hemorragia da região subcutânea abdominal, fluido peritoneal sanguinolento com infiltração local de células linfóides e lesões degenerativas nos rins, baço, fígado e intestinos (MAKLOSKI, 2011). Nos machos adultos, desencadeia orquite, epididimite, prostatite, atrofia testicular e sêmen de baixa qualidade, já a esterilidade pode acontecer em ambos os sexos e acarretar importantes perdas econômicas em cães de reprodutores. Nos machos, a esterilidade aparentemente está associada a um fenômeno autoimune, os cães tornam-se estéreis, sendo excluídos do manejo reprodutivo, uma vez que mesmo assintomáticos podem continuar a excretar bactérias pelo fluido seminal. Outros sinais clínicos frequentemente detectados incluem a linfonodomegalia, discoespondilite, acompanhada por dor aguda na coluna vertebral, osteomielite, claudicação, paralisia e ataxia e uveíte. Nos cães jovens, nos machos e nas cadelas não gestantes, linfonodomegalia generalizada é a manifestação clínica comumente identificada (TAUL; POWELL; BAKER, 1967; UEDA et al., 1974a; CARMICHAEL, 1976; FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976; SAEGUSA et al., 1977; SHOEB; MORTON, 1978; GEORGE; DUNCAN; CARMICHAEL, 1979; ANDERSON; BINNINGTON, 1983; SERIKAWA et al., 1984a; SERIKAWA et al., 1984b; GORDON et

al., 1985; SMEAK et al., 1987; KERWIN et al., 1992; THOMAS, 2000; LEDBETTER et al., 2009).

A ocorrência de febre é rara, uma vez que a infecção por *B. canis* induz pouca resposta inflamatória, apresentando baixa toxicidade celular. Alterações hematológicas nos cães acometidos também são raras, apesar da bacteremia prolongada (CHACÓN-DÍAZ et al., 2015). Infecções assintomáticas também podem ocorrer com frequência, com eliminação bacteriana pela via geniturinária por um período de tempo indeterminado, sendo que os cães afetados pela brucelose aparentemente permanecem cronicamente infectados por longos anos. A ocorrência de óbito é rara, exceto nos fetos e recém-nascidos (TAUL; POWELL; BAKER, 1967; CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; KEID et al., 2007a,b; CFSPH, 2012).

Lesões *post-mortem* em animais afetados pela infecção evidenciam linfonodos frequentemente aumentados, esplenomegalia, hepatomegalia, edema escrotal, atrofia e fibrose testicular, metrite e abscessos em órgãos internos (MOORE, 1969; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; UEDA et al., 1974b; CFSPH, 2012).

Nenhum tratamento é totalmente eficiente na erradicação da infecção, embora estudos *in vitro* demonstrem que a *B. canis* apresenta sensibilidade as tetraciclinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifamicina, fluoroquinolonas entre outros. A natureza intracelular do patógeno dificulta a ação antimicrobiana, de maneira que mesmo apresentando suscetibilidade a inúmeros antimicrobianos *in vitro*, estes dificilmente atingem concentrações adequadas no interior celular (CHACÓN-DÍAZ et al., 2015). Assim, após a aplicação da antibioticoterapia pode haver recidivas, conseqüentemente não se recomenda a manutenção, para fins reprodutivos, de um animal submetido à intervenção terapêutica. A aplicação da antibioticoterapia também apresenta algumas limitações, devido aos custos elevados com medicamentos, aplicação de doses elevadas, acarretando toxicidade, resultados incertos, tratamento prolongado e os possíveis riscos para a saúde pública (LEWIS et al., 1973; TERAKADO et al., 1978; FLORES-CASTRO; CARMICHAEL et al., 1981; JOHNSON et al., 1982; ZOHA; WALSH, 1982; NICOLETTI, 1991; MATEO-DE-ANTONIO; MARTÍN, 1995; WANKE, 2004; WANKE et al., 2006; HOLLETT, 2006; GLYNN; LYNN, 2008).

Para o diagnóstico da brucelose em cães é primordial a realização de uma cuidadosa anamnese, uma vez que o achado histórico mais comumente relatado é o de infertilidade, ainda assim, a elaboração de um exame físico completo no animal é necessária para averiguar a plena funcionalidade dos sistemas locomotor, reprodutor, ocular e linfático do cão suspeito.

Todavia, o diagnóstico da brucelose canina não pode ser fundamentado somente nos sinais clínicos, pois eles não são patognômicos da infecção e uma parcela significativa dos animais pode desenvolver a infecção assintomática. Para um diagnóstico definitivo, o exame clínico deve ser avaliado em conjunto com os testes microbiológicos, as técnicas sorológicas e moleculares, que por vezes podem variar em sensibilidade, especificidade e complexidade. A colheita de amostras de sangue total para uso nos testes de diagnóstico, principalmente cultivo microbiológico, deve ser executada, pois a bacteremia prolongada é uma característica típica da infecção por *B. canis*. Além disso, o material sanguíneo é mais facilmente aplicado nas técnicas de cultura microbiológica, apresenta praticidade na obtenção e, por ser uma amostra passível de se obter com esterilidade, evita a possível contaminação secundária do meio de cultivo (WANKE, 2004; KEID et al., 2007c; MAKLOSKI, 2011; CSFPH, 2012).

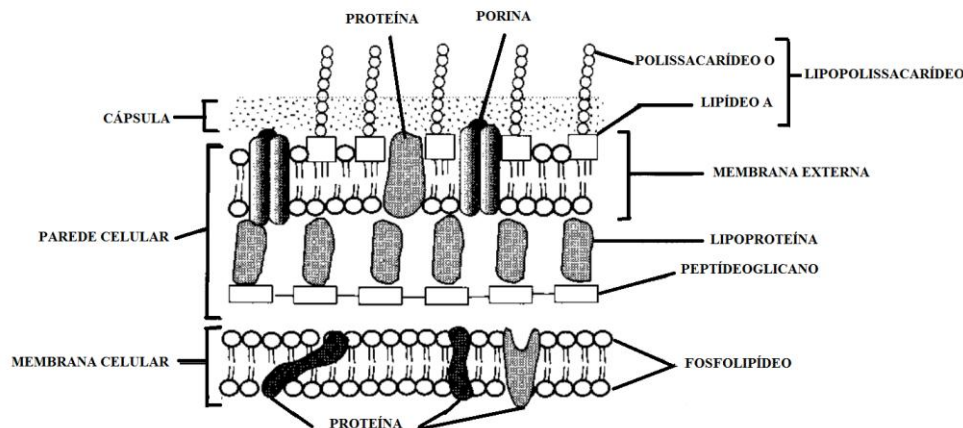
Os testes sorológicos são rotineiramente aplicados nos casos suspeitos de brucelose canina, como a prova de soroaglutinação lenta (SAL) (ALTON et al., 1976), a prova de soroaglutinação rápida (SAR) com e sem o emprego do 2-mercaptoetanol (SAR-ME) (BADAKHSH et al., 1982), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (MYERS; VARELA-DÍAZ; COLTORTI, 1974), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (MATEO-DE-ANTONIO et al., 1993; BALDI et al., 1994; CASSATARO et al., 2002; LUCERO et al., 2002; WANKE et al., 2002; BARROUIN-MELO et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2011; ESCOBAR et al., 2010) e ensaios imunocromatográficos (EIC) (KIM et al., 2007; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015). A maioria dos testes utiliza antígenos de superfície bacteriana, composto pelo lipopolissacarídeo rugoso (LPS-R) e por proteínas da membrana externa bacteriana, sendo o LPS-R o antígeno imunodominante.

Nas espécies lisas de *Brucella*, o LPS é composto pelo lipídeo A, inserido na membrana externa bacteriana, um núcleo e a cadeia O, que corresponde à estrutura mais externa da parede celular. A estrutura completa do LPS das brucelas ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se, atualmente, que o lipídeo A é composto pelo dissacarídeo de 2,3-diamino-2,3 dideoxi-D-glicose ligado a ácidos graxos. O núcleo tem 3-deoxi-D-mano-2-ácido octulosônico, manose, glicose, glicosamina e quinovosamina como os principais açúcares, e a cadeia O é composta por polímeros de N-formil-perosamina. Nas espécies rugosas, a cadeia O está ausente ou presente com poucos resíduos. A parede celular e estruturas adjacentes de bactérias Gram-negativas estão ilustradas na figura 1 (CORBEL, 1997; MORIYÓN et al., 1987).

Todavia, nos testes sorológicos há possibilidade de ocorrer a reação cruzada com outras cepas bacterianas, como *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*,

Pseudomonas aeruginosa e *Bordetella bronchiseptica*, devido ao compartilhamento de epítomos, o que pode resultar em resultados falso-positivos, sendo uma das desvantagens de alguns destes testes sorológicos, especialmente nos testes de aglutinação (GEORGE; CARMICHAEL, 1974; BADAQSH et al., 1982; CARMICHAEL; JOUBERT, 1987; KEID et al., 2009; KEID et al., 2015).

Figura 1 – Parede celular e estruturas adjacentes de bactérias Gram negativas



Fonte: (QUINN, P. J.; MARKEY, B. K, 2003).

Ademais, os resultados dos testes sorológicos são frequentemente negativos durante as quatro primeiras semanas pós-infecção mesmo na presença de bacteremia, antes da ocorrência da soroconversão. Os resultados falso-negativos também podem ser encontrados em animais na fase crônica da infecção, após o término da bacteremia, já que pela natureza intracelular da bactéria, os títulos de anticorpos predominam durante a fase de bacteremia. Embora os cães na fase crônica da infecção possam ser sorologicamente negativos, as bactérias podem ficar alojadas em nódulos linfáticos, fígado, baço e tecidos reprodutivos e esporadicamente recomeçam um novo processo de replicação (ZOHA; CARMICHAEL, 1982; LARSSON et al., 1984).

Atualmente considera-se que os testes sorológicos apresentam baixa sensibilidade quando comparados com a técnica de hemocultura. Resultados falso-negativos tem sido reportados com valores percentuais que variam de 10,42% a 72,02%, inclusive nos cães em bacteremia, dependendo do teste sorológico utilizado (KEID et al., 2007a; KIM et al., 2007; KEID et al., 2009; WANKE et al., 2012; KEID et al., 2015).

Cães que apresentam bacteremia são importantes fontes de infecção, embora alguns animais não apresentem sinais clínicos. Durante o período de bacteremia, as brucelas são eliminadas em grande quantidade por secreções e excreções, podem ser encontradas nas principais vias de eliminação, sendo necessário identificar rapidamente os cães infectados para prevenir a disseminação da doença para outros cães e seres humanos. O desenvolvimento de um teste de diagnóstico que efetivamente identifique estes animais no estágio de bacteremia é de extrema relevância para redução da propagação da *B. canis* (SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978; SAEGUSA et al., 1977; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; KEID et al., 2007a,b,c).

O isolamento bacteriológico é considerado o teste “padrão ouro” para identificação de *B. canis*, sendo realizado com amostras de sangue total e classificado como um teste confirmatório para a brucelose canina. A técnica de hemocultura é muito utilizada na detecção de *B. canis*, contudo a cultura microbiológica pode ser demorada, antibióticos utilizados no tratamento da brucelose ou de outras infecções podem interferir no crescimento, a bacteremia pode ser intermitente e o número de organismos no sangue pode ser baixo. Além disso, há riscos de transmissão humana durante a manipulação dos isolados de *B. canis* nos procedimentos de isolamento bacteriano em ambientes laboratoriais. O cultivo microbiológico promove o diagnóstico definitivo da brucelose canina, mas pode produzir resultados falso-negativos em situações de ausência temporária das bactérias na circulação sanguínea (ALTON et al., 1976; WALLACH et al., 2004; KEID et al., 2004; GLYNN; LYNN, 2008; CFSPH, 2012).

As amostras do trato genital (por exemplo, sêmen, secreções vaginais, placenta) podem auxiliar no diagnóstico da brucelose em animais com sinais reprodutivos. As brucelas também podem ser detectadas na urina, fetos (conteúdo gástrico, fígado, baço, pulmão), epidídimo, testículos e útero. Contudo, a sensibilidade do cultivo microbiológico empregando estes materiais pode ser variável, por depender da fase da infecção em que o animal se encontra e da eliminação bacteriana no momento da coleta das amostras, além disso, são materiais sujeitos à contaminação secundária. Assim, a sensibilidade do cultivo utilizando estas amostras biológicas tem se mostrado inferior à hemocultura (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; KEID et al., 2007a,b). Além disso, alguns materiais, como fetos, placentas, útero, testículos, epidídimos, nem sempre estão disponíveis para o diagnóstico (ALTON et al., 1976; SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979; GLYNN; LYNN, 2008; GYURANECZ et al., 2011; CFSPH, 2012).

Os métodos tradicionais de diagnóstico baseados no cultivo microbiológico de *Brucella* ainda são muito utilizados nos laboratórios clínicos, uma vez que permitem a obtenção de importantes informações sobre a viabilidade do patógeno e sensibilidade aos antibióticos. Contudo, a multiplicação lenta e a necessidade de meios de cultivo seletivos oferecem limites para o diagnóstico baseado somente na cultura microbiológica. Os últimos avanços na biologia molecular ao longo dos últimos dez anos incentivaram o surgimento de novas perspectivas na identificação microbiológica, assim atualmente as técnicas de biologia molecular são substancialmente comuns em laboratórios clínicos (YANG; ROTHMAN, 2004; MORI et al., 2009; YU; NIELSEN, 2010; SAHARAN et al., 2014).

A amplificação de ácidos nucleicos é uma valiosa ferramenta para o diagnóstico de enfermidades infectocontagiosas. Existem vários métodos de amplificação do material genético e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é o método mais comumente utilizado (MULLIS, 1990). As etapas desse teste genético incluem a extração de ácidos nucleicos dos espécimes, amplificação gênica e revelação do produto amplificado, sendo necessários equipamentos de alto valor agregado e instalações apropriadas que dificultam a aplicabilidade rotineira do teste molecular em algumas condições (YANG; ROTHMAN, 2004). Inúmeros ensaios baseados na técnica de PCR têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose em diversos hospedeiros (BRICKER, 2002; POESTER et al., 2010; YU; NIELSEN 2010; WANG et al., 2014)

Embora o isolamento bacteriano em amostras de sangue seja classificado como o teste “padrão ouro” para a identificação da *B. canis*, a PCR mostrou-se uma boa alternativa como diagnóstico direto da brucelose canina e supera algumas das principais desvantagens das técnicas bacteriológicas (KEID et al., 2007c). A técnica de PCR, quando comparada com a cultura microbiológica, apresenta as vantagens de ser relativamente rápida e ter alta sensibilidade e especificidade para detecção do DNA de *Brucella* spp. O fato de não depender da viabilidade bacteriana e não sofrer interferência de contaminantes, geralmente melhora a sensibilidade da técnica de PCR. Já a especificidade, depende fundamentalmente dos *primers* empregados (YANG; ROTHMAN, 2004). Alguns estudos demonstraram que a detecção das brucelas pela PCR tem sido realizada em amostras de sangue, suabes vaginais e sêmen de cães, porém a sensibilidade em amostras de sangue foi mais elevada (KEID et al., 2007a,b,c; KANG et al., 2014; KAUFFMAN et al., 2014).

Keid et al. (2007c) realizaram um estudo comparativo entre os testes microbiológicos, sorológicos e a PCR com *primers* direcionados a região interespaçadora 16S-23S do DNA codificador do RNA ribossomal (rDNA) para detecção de *Brucella* spp. em 210 amostras de sangue total canino. Com o teste de hemocultura usado como “padrão-ouro”, a técnica de PCR apresentou uma sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100%, com 64 animais diagnosticados como infectados e 50 não infectados. Dos 96 animais classificados como suspeitos para brucelose canina, mas negativos na hemocultura, a PCR possibilitou a detecção de 13 animais positivos. Os testes sorológicos aplicados nos cães infectados apresentaram sensibilidade de 82,81% (53/64) na SAR e 39,06% (25/64) na SAR-2ME, nos cães não infectados, a especificidade foi 100% em ambos os testes, já nos cães suspeitos, resultaram em 36,45% (35/96) e 2,08% (2/96) positivos na SAR e SAR-2ME, respectivamente. Os resultados obtidos no estudo evidenciam a alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR quando comparada com as outras técnicas de diagnóstico. A sensibilidade analítica da PCR para detecção de DNA de *B. canis* em amostras de sangue canino foi de 3,8 fg.

Keid et al. (2007a) avaliaram o desempenho da técnica de PCR com os *primers* direcionados para a região interespaçadora 16S-23S do RNA ribossomal (rDNA) para detecção de *B. canis* em 144 amostras de sangue e suabes vaginais de cadelas. Os resultados obtidos indicaram que a PCR apresentou sensibilidade bastante superior ao cultivo microbiológico em amostras de suabes vaginais, com seis animais diagnosticados como positivos pelo cultivo e 52 positivos pela PCR. Ao comparar a PCR aplicada em amostras de sangue e de suabes vaginais, a sensibilidade da PCR foi superior em amostras de sangue. Ao analisar os resultados obtidos pela PCR em sangue e/ou PCR em suabes vaginais, verificou-se que o número de animais positivos foi superior ao detectado pelos testes sorológicos de SAR e SAR-2ME.

O potencial de detecção de *B. canis* pela técnica de PCR também foi avaliada por Keid et al. (2007b) em amostras de sangue e sêmen canino de 52 cães, empregando-se os *primers* direcionados para a região interespaçadora 16S-23S do rRNA. Com esse estudo foi possível concluir que a técnica de PCR aplicada a amostras de sêmen apresentou maior sensibilidade em relação ao cultivo microbiológico, possibilitando o diagnóstico de brucelose em 34,61% dos 52 cães, enquanto que 21,1% foram positivos pelo cultivo. Ao comparar o desempenho da PCR em sangue com a PCR aplicada em amostras de sêmen, ambos detectaram porcentagens similares de animais positivos, com uma concordância moderada entre os testes. Contudo, amostras de sêmen são mais difíceis de obter quando comparadas às amostras de sangue.

Além disso, um maior número de animais apresentou resultado positivo na PCR em sêmen e/ou sangue, quando comparado aos testes sorológicos de SAR e SAR-2ME.

Kang et al. (2014) relataram que devido às inúmeras desvantagens apresentadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico, uma variedade de técnicas moleculares utilizando o DNA de *Brucella* spp. já foram desenvolvidas para detecção de *B. canis*. O objetivo do estudo de Kang et al. (2014) foi a aplicação de um teste de PCR específico para detecção de *B. canis* em amostras de sangue, obtidas de 13 cães positivos para brucelose pela hemocultura e pelos testes de SAR-2ME e EIC. A região BCAN_B0548 do cromossomo II foi escolhida para desenho dos *primers* e a PCR desenvolvida foi capaz de detectar até 6 pg/ μ l de DNA de *B. canis* em amostras de DNA extraído de sangue total canino e até 60 fg/ μ l de DNA de *B. canis* em amostras de DNA extraído da camada de leucócitos e plaquetas do sangue. Dos 13 cães infectados avaliados, apenas 8 foram positivos pela técnica de PCR aplicada em amostras de DNA obtidas da camada de leucócitos e plaquetas do sangue, indicando uma sensibilidade diagnóstica em relação à hemocultura de 61,53%.

Em estudo publicado por Kauffman et al. (2014) a detecção da *B. canis* foi realizada em amostras de sangue total de 105 cães pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) específica para *B. canis*, dos quais 36 foram considerados positivos sorologicamente. Os resultados da PCR indicaram 100% de especificidade e 16,67% de sensibilidade, quando comparados com os testes sorológicos de 2ME-SAR e IDGA. Os *primers* utilizados no estudo foram direcionados para o gene *omp25* de *B. canis*.

Notomi et al., (2000) desenvolveram um novo método de diagnóstico molecular denominado LAMP (amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop*) que amplifica sequências de DNA em um curto período de tempo sob condições isotérmicas. O mecanismo da reação de LAMP envolve um processo cíclico com síntese e deslocamento da cadeia de DNA, executado por uma enzima *DNA polimerase* específica e um conjunto de dois *primers* internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3). A adição de dois *primers* denominados *loop forward* e *loop backward* aceleram a reação proporcionando maior sensibilidade ao teste (NAGAMINE et al., 2002). A amplificação gênica procede através da repetição de dois tipos de reações de alongamento nas regiões do *loop* e a reação pode ser processada em uma temperatura constante. Os produtos resultantes da LAMP são os *stem-loops* e estruturas com múltiplos *loops*, induzidos pelo *annealing* entre as repetições alternadamente invertidas da

sequência alvo na mesma cadeia (NOTOMI et al., 2000; TOMITA et al., 2008; NOTOMI et al., 2015).

As principais características da técnica incluem a amplificação em uma temperatura constante, *primers* internos que amplificam com uma especificidade muito maior quando comparado com outros testes moleculares e a reação ocorre em um período de tempo muito curto, no máximo uma hora. A LAMP amplifica o material genético com maior eficiência, uma vez que a enzima utilizada durante o processo de amplificação apresenta maior resistência aos fatores inibitórios. Outra característica importante é que pequenas quantidades de DNA podem ser amplificadas tornando-a similar a técnica de PCR em termos de sensibilidade. A alta especificidade da LAMP é atribuída ao reconhecimento da sequência alvo através de seis independentes sequências de *primers* no estágio inicial e de quatro sequências independentes durante os estágios posteriores da reação. O teste molecular LAMP é simples e de fácil execução e pode ser realizado em termociclador ou utilizar equipamentos de menor custo, como banho-maria ou bloco térmico seco. Essas características reforçam a principal vantagem da LAMP em relação à técnica convencional de PCR. A combinação de rapidez, simplicidade e precisão possibilita a aplicação de LAMP em vários tipos de análises clínicas, genéticas, produtos alimentícios e amostras ambientais (NOTOMI et al., 2000; MORI et al., 2009; MORI et al., 2013; SOLEIMANI et al., 2013; NOTOMI et al., 2015; KANG et al., 2015).

De acordo com Mori et al. (2013) inúmeros estudos que enfatizaram a aplicação da técnica de LAMP já foram publicados e aumentam a cada ano desde o seu primeiro relato. Diversos grupos de pesquisa padronizaram a reação de LAMP para a detecção de microrganismos patogênicos, com a observação do desempenho da técnica comparando-a aos outros ensaios moleculares, como por exemplo, o teste de PCR. Para aumentar a rapidez e facilitar a detecção dos agentes patogênicos, alguns *kits* foram desenvolvidos por pesquisadores e estão disponíveis para o uso comercial (SAHARAN et al., 2014). A alta eficiência da LAMP reforça a promissora potencialidade como ferramenta de diagnóstico na vigilância epidemiológica e no controle de diversas doenças infecciosas sem a necessidade de equipamento sofisticado ou pessoal qualificado (PARIDA et al., 2008; NJIRU et al., 2012).

O primeiro relato da detecção de *Brucella* spp. através da técnica de LAMP foi realizado por Ohtsuki et al. (2008) e avaliaram a especificidade e sensibilidade analíticas, utilizando seis espécies do gênero *Brucella*, inclusive a *B. canis*, bem como outras espécies

bacterianas. Os *primers* utilizados foram direcionados para o gene *bcs31* de *Brucella*. A reação de LAMP mostrou-se específica, possibilitando a amplificação de DNA de todas as cepas de *Brucella* testadas, sem amplificação das demais espécies bacterianas, enquanto que o limiar de detecção foi de 10 fg do DNA de *Brucella*.

Soleimani et al. (2013) avaliaram a reação de LAMP quantitativa em tempo real para o diagnóstico de brucelose utilizando os *primers* direcionado ao gene *omp25*, altamente conservado em todas as espécies de *Brucella*. Para avaliar a especificidade analítica da técnica foram utilizados DNA genômico de *B. abortus*, *B. melitensis* e de bactérias não pertencentes ao gênero *Brucella*. A avaliação da sensibilidade analítica foi realizada empregando-se diferentes concentrações de DNA de *Brucella*. Os resultados demonstraram uma alta sensibilidade analítica, com detecção de até 0,56 fg de DNA de *Brucella*, além de ser específico para detecção de bactérias do gênero *Brucella*. O teste, porém, não foi avaliado em amostras biológicas de indivíduos naturalmente infectados.

Trangoni et al. (2015) avaliaram a capacidade da reação de LAMP para detecção de *Brucella* spp. utilizando a cepa S2308 de *B. abortus* com *primers* direcionados ao gene *bcs31*, altamente conservado no gênero *Brucella*. O teste foi comparado com uma reação de PCR utilizando *primers* direcionados ao mesmo gene. A especificidade do protocolo foi determinada utilizando-se cepas de *Ochrobacterium anthropi*, uma espécie bacteriana filogeneticamente semelhante às brucelas. O limiar de detecção do teste de LAMP e de PCR foi de 50 fg de DNA de *Brucella* e as reações não detectaram DNA de *O. anthropi*.

Kang et al. (2015) aplicaram um teste de LAMP específico para detecção de *B. abortus* em 20 amostras de linfonodos e seis amostras de camada de leucócitos e plaquetas do sangue de bovinos obtidas em matadouro. Para reação de amplificação foram empregados *primers* direcionados à região gênica BruAb2_0128 do cromossomo I. A especificidade analítica do ensaio de LAMP foi mensurada com o DNA genômico de outras espécies de *Brucella* e cepas de outras espécies bacterianas filogeneticamente ou antígenicamente similares à brucelas. Os resultados do teste de LAMP apresentaram alta sensibilidade analítica, permitindo a amplificação de até 20 fg/ μ l de DNA de *B. abortus*, bem como alta especificidade analítica, por permitir a amplificação de todos os biovares de *B. abortus*, mas não amplificar DNA de outras espécies de *Brucella* ou outras espécies bacterianas. Das 26 amostras clínicas testadas, 19 foram positivas pelo isolamento bacteriano e 17 pelo teste de LAMP.

Lin et al. (2011) compararam o desempenho no diagnóstico para detecção de *Brucella* spp. entre as técnicas de LAMP e PCR em *nested*, baseadas na região gênica *omp25*, em 78 amostras de leite e 113 amostras de sangue provenientes de ruminantes e 11 amostras de sangue humano positivos para brucelose. Os resultados confirmaram o alto potencial diagnóstico da LAMP em confirmar infecções por *Brucella* spp. em amostras de sangue e leite de animais naturalmente infectados. O teste de LAMP apresentou sensibilidade analítica dez vezes superior à reação de PCR em *nested*, com detecção de até 9 fg/ μ l de DNA e apresentou uma taxa de concordância de 99% quando comparado com a técnica de PCR *nested*. Quanto à especificidade diagnóstica, o teste demonstrou ser equivalente à PCR *nested*.

Song et al. (2012) realizaram um estudo comparativo para avaliar o método LAMP em conjunto com a PCR convencional baseado na região gênica *omp25* para detecção de *Brucella* spp. No teste, reações positivas foram observadas em todas as espécies de brucelas testadas, enquanto que as espécies bacterianas não brucélicas resultaram negativas, confirmando a alta sensibilidade e especificidade analíticas do método de LAMP. As reações de LAMP e PCR permitiram detectar, respectivamente, até $3,81 \times 10^1$ e $3,81 \times 10^2$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml de *Brucella*. O teste de LAMP foi avaliado ainda em 59 amostras de sangue ovino e 110 amostras de leite bovino, das quais cinco e sete foram positivas, respectivamente.

Pérez-Sancho et al. (2013) desenvolveram e avaliaram o teste de LAMP baseado na sequência de inserção *IS711* para detecção de *Brucella* spp. em amostras clínicas de pequenos ruminantes, em paralelo com os métodos de PCR em tempo real com *primers* direcionados à *IS711* e bacteriológico. Do total de 17 amostras de tecidos fetais, 14 (82,4%) foram positivos em todos os testes, do total de 21 amostras de linfonodos, 9 (42,95%) foram positivas nas técnicas moleculares e 10 (47,6%) no bacteriológico e do total de 14 amostras de leite, 12 (85,7%) foram positivas nas três técnicas.

A eficiência da técnica de LAMP baseada na região gênica *IS711* para detecção de *Brucella* spp. foi reafirmada por Zador et al (2015) confirmando também a inexistência de reações cruzadas com outras espécies bacterianas e a expressiva sensibilidade analítica da técnica de LAMP. Para sensibilidade foram utilizadas cepas de *B. abortus* e *B. melitensis* e de acordo, com os resultados obtidos, a técnica de PCR detectou até 7,5 pg de DNA e a LAMP detectou até 75 fg de DNA, demonstrando que a técnica de LAMP foi 100 vezes mais sensível que a técnica de PCR.

De acordo com o Plano Nacional de Saúde de 2013, publicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi estimada uma população de 52,2 milhões de cães domiciliados no país, equivalente a 1,8 animal por domicílio. Esses dados alertam para necessidade da implantação de medidas de controle e prevenção das doenças infectocontagiosas dos animais de companhia, que podem ser transmitidas para os seres humanos, como a brucelose canina. Os testes de diagnóstico são ferramentas essenciais para detecção dessas enfermidades comumente encontradas nos animais domésticos.

No caso da brucelose, são utilizadas as técnicas de cultivo microbiológico, sorológicas e biomoleculares para o diagnóstico, contudo todas elas apresentam vantagens e desvantagens. A baixa sensibilidade apresentada pelos testes sorológicos comumente empregados para a detecção de cães portadores da *B. canis* é uma das principais desvantagens no diagnóstico da enfermidade (KEID et al., 2015). Especialmente durante a fase de bacteremia, os cães são importantes fontes de transmissão da infecção (KEID et al., 2007a,b; UEDA et al., 1974a; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978) e precisam ser identificados rapidamente para impedir a transmissão da doença para os outros animais e seres humanos (LUCERO et al., 2010a). O desenvolvimento de um teste de diagnóstico que consiga identificar com eficácia os animais durante esta fase seria de extrema relevância para remover estes animais da população e assim reduzir a propagação da *B. canis*, uma vez que não há vacina disponível para prevenir a infecção e a identificação e segregação dos animais acometidos constitui a principal medida de controle da enfermidade (HOLLETT, 2006; MAKLOSKI, 2011).

As técnicas de biologia molecular, como os testes de PCR e LAMP são ferramentas importantes para o diagnóstico da brucelose, por permitir um diagnóstico de elevada sensibilidade e especificidade. Ensaios de PCR já foram desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose canina em várias amostras, utilizando *primers* direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* (Keid et al., 2007a,b,c). Quando desenvolvidos, estes *primers* foram considerados específicos para o gênero *Brucella*. Contudo, foram observados resultados falso-positivos em um estudo que teve como objetivo investigar a ocorrência de brucelose em cetáceos da espécie *Inia geoffrensis* de vida livre no Brasil, sendo detectadas bactérias pertencentes à espécie *Ochrobactrum intermedium*, que é geneticamente relacionada às brucelas (ROCCA, 2014). Esta espécie bacteriana tem sido associada a infecções oportunistas nos humanos e em animais, tendo sido descrita, recentemente uma infecção em cão (FRANCI et al., 2015). Assim, o desenvolvimento de uma

PCR empregando *primers* direcionados a outras regiões gênicas é desejável para garantir a ausência de resultados inespecíficos na PCR.

A técnica de LAMP, quando comparada com a PCR, apresenta diversos benefícios, como a rapidez e o menor custo de aplicação e eficiência na detecção por apresentar altos valores de sensibilidade e especificidade. Porém, reações de LAMP até o momento não foram utilizadas para o diagnóstico da brucelose nesta espécie animal. Todas essas características justificam a necessidade de avaliação comparativa do potencial das duas técnicas moleculares para o diagnóstico da brucelose canina.

Sequências de inserção (IS) foram identificadas no genoma de bactérias do gênero *Brucella*, e primeiramente caracterizadas em cepas de *B. ovis*, sendo denominadas *IS711*. Essa região é considerada conservada entre as brucelas, porém o local de inserção e a quantidade de cópias variam de acordo com cada espécie (HALLING; ZEHR, 1990; HALLING; TATUM; BRICKER, 1993; OUAHRANI et al., 1993; BOUNAADJA et al., 2009; MANCILLA et al., 2011). Esses elementos genéticos móveis estão presentes em uma grande variedade de gêneros bacterianos e são caracterizados como repetidas sequências de DNA polimórfico, com uma simples organização genética e inseridos em múltiplos sítios da molécula de DNA (OCAMPO-SOSA; GARCÍA-LOBO, 2008; SIGUIER et al., 2014).

Seis fragmentos de *IS711* foram descritos no genoma da cepa de referência (RM6/66) de *B. canis* (HALLING; ZEHR, 1990; HALLING; TATUM; BRICKER, 1993; OUAHRANI et al., 1993; BOUNAADJA et al., 2009; MANCILLA et al., 2011), tornando a *IS711* um alvo interessante para o desenho de *primers*. Pressupõe-se que o uso de *primers* provenientes de um marcador molecular com múltiplas cópias pode intensificar a sensibilidade da reação. Os *primers* descritos por Bounaadja et al. (2009), porém, são direcionados a uma região da *IS711* que não é completamente conservada entre as diversas cepas de *B. canis*, o que pode prejudicar ou reduzir a eficiência da amplificação de algumas variantes dentro desta espécie. Assim, por ser considerada específica do gênero *Brucella* e ocorrer em múltiplas cópias no genoma, a *IS711* pode ser uma região alternativa para o desenvolvimento de *primers* a serem usados nos testes de PCR e LAMP, com o objetivo de desenvolver um método diagnóstico de elevada sensibilidade e especificidade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Avaliar comparativamente o desempenho diagnóstico dos testes moleculares de PCR convencional e LAMP para o diagnóstico da brucelose canina em amostras de sangue total oriundas de cães naturalmente infectados e de cães não infectados por *B. canis*.

3.2 ESPECÍFICOS

Desenho de *primers* direcionados à sequência de inserção *IS711* para aplicação nas técnicas moleculares de PCR e LAMP para a detecção de *Brucella* spp.

Padronização das técnicas de PCR e LAMP com o uso de *primers* direcionados à sequência de inserção *IS711*, utilizando-se DNA obtido de isolados de *Brucella*.

Avaliar o desempenho dos testes de PCR e LAMP para o diagnóstico da brucelose canina em cães naturalmente infectados utilizando amostras de sangue total canino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (protocolo número CEUA N° 9290230216), um total de 57 cães foram utilizados neste estudo: 17 cães provenientes de canil comercial com histórico de problemas reprodutivos caracterizados por abortamentos, natimortos e falhas de concepção, os quais foram amostrados em cinco ocasiões diferentes e um cão com sorologia positiva. Além desses, 18 cães com suspeita clínica ou epidemiológica da infecção, 21 cães não reprodutores, sem sinal clínico ou

evidência epidemiológica de brucelose e cães provenientes de canil livre de infecção por *B. canis* também foram usados e amostrados uma única vez.

Os animais foram submetidos à anamnese e exame clínico para confirmação dos seguintes sinais clínicos indicativos de brucelose: descarga vaginal fora do período de estro ou pós-parto, abortamento, natimortos, nascimento de filhotes debilitados, orquite, epididimite, falha de concepção, aumento de linfonodos poplíteos e mandibular e sensibilidade na região da coluna vertebral e febre. Foram considerados sinais clínicos observados no momento da amostragem e num período de um ano anterior à data de amostragem e também foram consideradas evidências epidemiológicas da infecção, como o contato com cães infectados por *B. canis* ou com sinais clínicos sugestivos da infecção.

Cinco mililitros de sangue total foram assepticamente coletados de todos os cães, através de punção intravenosa das veias jugular ou cefálica e acondicionados em tubos de ensaio a vácuo e estéreis, com adição de citrato de sódio. As amostras coletas foram mantidas refrigeradas por um período máximo de 24 horas, até o processamento laboratorial. As amostras foram separadas em duas alíquotas de 1 mL, sendo uma delas imediatamente utilizada no cultivo microbiológico e a outra congelada a -20°C até a realização do procedimento de extração de ácidos nucléicos. Um total de 98 amostras de sangue foram analisadas.

4.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Cepas *Brucella* spp. foram utilizadas para determinar a sensibilidade analítica dos testes moleculares e cepas de espécies bacterianas geneticamente ou antigenicamente similares a *Brucella* spp., bem como aquelas comumente relatadas em infecções caninas (CARMICHAEL; GREENE, 2012) foram usadas para determinar a especificidade analítica das técnicas de PCR e LAMP (Quadro 2).

As cepas de *Brucella*, mantidas congeladas em meio caldo triptose acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) e 25% de glicerol à temperatura de -80°C, foram descongeladas, semeadas em ágar triptose (Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e incubadas em aerobiose, a 37°C, durante 72 horas.

As cepas de *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marscencens*, *Citrobacter freundii*, mantidas congeladas em meio caldo nutriente (Kasvi) acrescido de 25% de glicerol à temperatura de -80°C, foram descongeladas, semeadas em ágar nutriente (Kasvi) e incubadas em aerobiose, a 37°C, durante 48 horas, exceto *S. marscencens*, que foi incubada a 25°C.

Cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mantidas congeladas em meio caldo tríptico de soja (Kasvi) acrescido de 25% de glicerol à temperatura de -80°C foram descongeladas, semeadas em placas de Petri contendo ágar tríptico de soja (Kasvi) e incubadas em aerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Já as cepas de *Listeria* spp. e *Enterococcus faecalis*, mantidas em caldo infusão cérebro coração (Kasvi) acrescido de 25% de glicerol à temperatura de -80°C, foram descongeladas, semeadas em placas de Petri contendo ágar infusão cérebro coração (Kasvi) e incubadas em aerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Uma cepa de *Leptospira interrogans*, sorogrupo Canicola sorovar Canicola, mantida em meio EMJH (Difco, Detroit, EUA), incubada em aerobiose à temperatura de 28°C também foi utilizada.

Após a verificação de crescimento e avaliação de pureza, pela coloração de Gram (ALTON et al., 1976), as colônias bacterianas provenientes de cada uma das cepas foram submetidas à extração de DNA.

As cepas de referência de *Brucella* spp. foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marisa da Costa, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; a cepa de *Staphylococcus aureus* foi gentilmente cedida pelo Prof. Ricardo Luiz Moro de Souza, do Laboratório de Higiene Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. As cepas de campo de *B. canis* e *O. intermedium* foram isoladas no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As demais cepas de referência foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz.

Quadro 2 – Cepas bacterianas utilizadas no estudo

(continua)

ESPÉCIE	CEPA	FONTE
<i>Brucella abortus</i> bv. 1	544/ATCC 23448	UFRGS
<i>Brucella suis</i> bv. 1	1330/ATCC 23444	UFRGS

(conclusão)

ESPÉCIE	CEPA	FONTE
<i>Brucella ovis</i>	63/290/ATCC 25840	UFRGS
<i>Brucella canis</i>	RM6/66/ATCC 23365	UFRGS
<i>Brucella canis</i>	BR89/14/Isolado de campo	LADIP/FMVZ/USP
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LMG 3331/ ATCC 49188	FIOCRUZ
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	BR417/11/Isolado de campo	LADIP/FMVZ/USP
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922/ CENT 0310	CENT/FIOCRUZ
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290/ CENT 0327	CENT/FIOCRUZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853/ CENT 0339	CENT/FIOCRUZ
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880/ CENT 0328	CENT/FIOCRUZ
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	CENT/FIOCRUZ
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	CENT/FIOCRUZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	LHZ/FZEA/USP
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC 13076	CENT/FIOCRUZ
<i>Listeria monocytogenes</i>	CLIST 02032	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria innocua</i>	CLIST 02050	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria ivanovii</i>	CLIST 02056	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria welshimeri</i>	CLIST 02060	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria seeligeri</i>	CLIST 02065	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria grayi</i>	CLIST 02069	CLIST/FIOCRUZ
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	CLIST 02070	CLIST/FIOCRUZ
<i>Lepstospira interrogans</i> sorogrupo Canicola, sorovar Canicola	CLEP 00003	CLEP/FIOCRUZ

ATCC: *American Type Culture Collection* (EUA); UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil); CLIST/FIOCRUZ: Coleção de *Listeria* da Fundação Oswaldo Cruz (Brasil); CLEP/FIOCRUZ: Coleção de *Leptospira* do Laboratório de Referência Nacional para *Leptospira* da Fundação Oswaldo Cruz (Brasil); CENT/FIOCRUZ: Coleção de Enteropatógenos Bacterianos da Fundação Oswaldo Cruz (Brasil); LMG: Laboratório de Microbiologia *Gent* (Bélgica); LHZ/FZEA/USP: Laboratório de Higiene Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (Brasil); LADIP/FMVZ/USP: Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3 HEMOCULTURA

Um mililitro de cada amostra de sangue total canino foi semeado num volume de 10 mL de caldo triptose (Difco, Detroit, EUA), suplementado com 5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e incubado em atmosfera de aerobiose, a 37°C, por 30 dias. A cada quatro

dias foram realizados subcultivos em placas de Petri contendo ágar triptose (Difco, Detroit, EUA), suplementado com 5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e incubadas a 37°C, em aerobiose por sete dias. As colônias isoladas foram posteriormente submetidas à identificação bacteriana por métodos morfológicos (ALTON et al., 1976). Isolados com morfologia macroscópica compatível com *Brucella* e na forma de cocobastonetes Gram-negativos, foram submetidos ao procedimento de extração de ácidos nucléicos para posterior identificação molecular, empregando a multiplex-PCR denominada Bruceladder (LÓPEZ-GOÑI et al., 2011).

4.4 DESENHO DOS *PRIMERS*

Um total de 465 sequências de *IS711*, representativas de todas as espécies de *Brucella* foram obtidas a partir da base de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information*, no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, com o auxílio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997) e alinhadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) para identificação das regiões com alta similaridade entre as sequências alinhadas, para serem utilizadas no desenho dos *primers*. Assim, foram desenhados um par de *primers* para reação de PCR e seis *primers* para a reação de LAMP, compreendendo: um par de *primers* internos (FIP e BIP), um par de *primers* externos (F3 e B3) e um par de *loop primers* (Quadro 3). Os *primers* para PCR foram desenhados utilizando o programa Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007, UNTERGASSER et al, 2012), utilizando a sequência de *IS711* da estirpe de referência RM6/66 de *B. canis* (número de acesso no Genbank CP007758). Os *primers* para a reação de LAMP foram desenhados utilizando-se o programa Primer Explorer versão 3 (Eiken Chemical, Tóquio, Japão), disponível no sítio: <http://primerexplor-er.jp/e/>. Após os desenhos dos *primers*, os mesmos foram verificados quanto à especificidade utilizando o programa Primer-Blast (YE et al., 2012).

Quadro 3 – Sequência de *primers IS711* desenhados para as reações de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP) para detecção de *Brucella* spp.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
PCR-IS-517F22	5'-TGTCCGCAAGCTTCAAGCCTTC-3'
PCR-IS-755R24	5'-CGGTCAATGTTTTCTCGCATCGCA-3'
LAMP-IS711-F3-107b	5'-CGGATCGAAGCATATCTTCC-3'
LAMP-IS711-B3-380b	5'-CATCTGCGTGGACTTTTCG-3'
LAMP-IS711-FIPb	5'-GGCATGAACCGCTGTCCAGACGCCATCTTGTGGATG-3'
LAMP-IS711-BIPb	5'CACGCCGGTGTATGGGAAAGGTGCTATCAATGAGG ACATAT-3'
LAMP-IS711-LF-237b	5'-AAGGTCGCAGGCAGATCG-3'
LAMP-IS711-LB-316b	5'-GGCTGATACGCCGGACTT-3'

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS COLÔNIAS BACTERIANAS

Os procedimentos para extração de DNA bacteriano foram baseados em protocolos previamente descritos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; KEID et al., 2007c). Utilizando-se alças bacteriológicas descartáveis e estéreis, colônias bacterianas foram coletadas das placas e ressuspendidas em 500 µl de tampão de lise contendo 10 mM de Tris-HCl; 25 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 100 mM de cloreto de sódio (NaCl); 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,4 mg/ml de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em termobloco a 37°C, *overnight*.

A purificação das amostras lisadas foi realizada conforme Keid et al. (2007c), adicionando-se 70 µL de NaCl a 5M e 65 µL de uma solução contendo 1% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) e 70 mM de NaCl (CTAB/NaCl) com incubação a 65°C, durante 10 minutos para remoção de debris celulares e polissacarídeos. Em seguida, foi acrescentado um volume de 640 µL de clorofórmio. Após centrifugação a 13.000 x g durante 10 minutos, a fase aquosa, contendo o DNA foi transferida, num volume de 500 µL para um

novo microtubo, sendo acrescentados 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1). Após nova centrifugação a 13.000 x g durante 5 minutos, a fase aquosa, contendo o DNA foi transferida novamente, num volume de 400 µL, para um novo microtubo, sendo acrescentados 400 µL de clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas 13.000 x g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante contendo o DNA, no volume de 300 µL, transferido para novo microtubo, e posteriormente precipitado com a adição de 300 µL álcool isopropílico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos para precipitação do DNA. Após remoção de álcool isopropílico, as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos. Após a remoção do etanol 70% e secagem do sedimento de DNA, o mesmo foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, e 1 mM de EDTA, pH 8,0) e incubado a 56° C durante 30 minutos, sendo então acondicionado a -20° C até a realização das reações de amplificação.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE TOTAL CANINO

Os procedimentos para extração de DNA de sangue foram baseados em protocolos previamente descritos, com algumas modificações (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; KEID et al., 2007c). As amostras de sangue total no volume de 1 mL foram centrifugadas a 13.000 x g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento resuscitado em tampão TE até o volume de 1 mL. Os procedimentos de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com tampão TE foram repetidos até que o sedimento apresentasse coloração clara, indicando remoção de hemácias e plasma sanguíneo e sedimentação dos leucócitos. O sedimento obtido foi ressuscitado em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 1,2% de Triton X-100 e 20 mg/mL de lisozima, num volume total de 250 µL e incubado a 37°C durante 2 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos contendo 250 µL de tampão de lise contendo 10 mM de Tris-HCl; 25 mM de EDTA; 1% de SDS e 0,4 mg/ml de proteinase K) e uma mistura de 0,2 g de zircônia a 1,0 mm e 0,1 g de pérolas de sílica/zircônia a 0,1 mm (Biospec, Bartlesville, EUA).

Após incubação a 37° C, *overnight*, as amostras foram submetidas à centrifugação rápida para precipitação da mistura de sílica e zircônia e o sobrenadante, no volume de 450

μL , foi transferido para novo microtubo. A purificação das amostras lisadas foi realizada conforme Keid et al. (2007c), adicionando-se 63 μL de NaCl a 5M e 59 μL de uma solução de 1% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) e 70 mM de NaCl com incubação a 65°C, durante 10 minutos para remoção de debris celulares e polissacarídeos. Em seguida, foi acrescentado um volume de 640 μL de clorofórmio. Após centrifugação a 13.000 x g durante 10 minutos, a fase aquosa, contendo o DNA foi transferida, num volume de 500 μL , para um novo microtubo, sendo acrescentados 500 μL de fenol:clorofórmio (1:1). Após nova centrifugação a 13.000 x g durante 5 minutos, a fase aquosa contendo o DNA foi transferida novamente, num volume de 400 μL , para um novo microtubo, sendo acrescentados 400 μL de clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 x g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante, no volume de 300 μL contendo DNA, transferido para novo microtubo, e posteriormente precipitado com a adição de 300 μL álcool isopropílico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos para precipitação do DNA. Após remoção de álcool isopropílico, as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos. Após a remoção do etanol 70% e secagem do sedimento de DNA, o mesmo foi ressuspenso em 30 μL de tampão TE e incubado a 56° C durante 30 minutos, sendo então acondicionado a -20°C até a realização das reações de amplificação.

Em cada lote de extração, foi incluído um controle negativo a cada duas amostras de sangue total canino, composto por um mililitro de água ultrapura, que foi submetido aos mesmos procedimentos de lavagem, lise, purificação, precipitação e amplificação de DNA.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA E PREPARO DAS DILUIÇÕES SERIADAS

A amostra de DNA obtida da cepa de referência *B. canis* RM6/66 e de uma cepa de campo de *B. canis* foram quantificadas em espectrofotômetro Denovix DS-11 FX (DeNovix Wilmington, USA) para análise da pureza e estimativa da concentração de DNA obtido. De acordo com a leitura espectrofotométrica, a concentração de DNA obtida a partir da cepa de referência de *B. canis* foi de 27,11 ng/ μL , com as razões 260/280 no valor de 1,92 e 260/230 no valor de 1,95, sendo o valor de absorvância no comprimento de onda de 260 nm de 0,54. Já a cepa de campo, apresentou a concentração de 24,63 ng/ μL , com as razões 260/280 no

valor de 1,88 e 260/230 no valor de 1,49 sendo o valor de absorvância no comprimento de onda de 260 nm de 0,493.

Após quantificação, as amostras de DNA obtidas das cepas de *B. canis* foram submetidas à diluição seriada na base dez, em duplicata, sendo uma realizada em tampão TE e a outra em suspensões de DNA de sangue canino em *pool*, obtendo-se um total de dez suspensões com concentrações decrescentes de DNA para cada cepa: 2,711 ng/ μ l, 271,1 pg/ μ l, 27,11 pg/ μ l, 2,711 pg/ μ l, 271,1 fg/ μ l, 27,11 fg/ μ l, 2,711 fg/ μ l, 271,1 ag/ μ l, 27,11 ag/ μ l, 2,711 ag/ μ l para a cepa de referência de *B. canis*; e 2,463 ng/ μ l, 246,3 pg/ μ l, 24,63 pg/ μ l, 2,463 pg/ μ l, 246,3 fg/ μ l, 24,63 fg/ μ l, 2,463 fg/ μ l, 246,3 ag/ μ l, 24,63 ag/ μ l, 2,463 ag/ μ l para a cepa de campo de *B. canis*). As últimas sete diluições de cada cepa em TE e em sangue foram empregadas nas reações de amplificação.

O *pool* de DNA de sangue canino total foi obtido de cinco cães negativos para brucelose, provenientes de canil controlado para infecção por *B. canis*.

As amostras foram mantidas a -20° C até a realização das reações de amplificação de DNA para determinação da sensibilidade analítica dos *primers* desenhados. A sensibilidade analítica foi determinada utilizando tanto as suspensões contendo diferentes quantidades de DNA de *B. canis* em tampão TE, quanto às suspensões de DNA obtidas de sangue total canino experimentalmente contaminadas com diferentes quantidades de DNA de *B. canis*.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA PCR E LAMP

Após determinação das condições ótimas de amplificação, a reação de PCR com os *primers* desenhados para a sequência de inserção *IS711* foi padronizada num volume final de 50 μ L, contendo: tampão de reação 1X (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,6 μ M de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 5 μ L de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94° C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por

40 segundos, *annealing* a 59° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 40 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72° C por 10 minutos.

Após determinação das condições ótimas de amplificação, a reação de LAMP com os *primers* desenhados para a sequência de inserção *IS711* foi padronizada num volume final de 25 µL, contendo: tampão de reação 1X [20 mM de Tris-HCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 10 mM de KCl, 2 mM de MgSO₄, 0,1% de Triton X-10, pH 8,8], 6 mM de MgSO₄, 1,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,4 µM dos *primers* FIP e BIP 0,2 µM dos *primers* F3 e B3, 0,4 µM dos *primers* Loop F e Loop B, 320 U/µL de *Bst* DNA Polymerase Large Fragment (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e 2,5 µL de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) nas seguintes condições: 65° C por 60 minutos, seguido por uma desnaturação a 80° C durante 2 minutos.

A cada procedimento de amplificação foram incluídos um controle negativo e um controle positivo de amplificação compostos, respectivamente, por água ultrapura e DNA da cepa de referência RM6/66 de *B. canis*, além dos controles negativos incluídos durante o procedimento de extração.

Todas as amostras de DNA obtido de sangue canino que apresentaram resultado negativo nas duas reações (PCR e LAMP) para detecção de *Brucella* spp., foram submetidas à PCR para um gene interno, codificador da β-actina, para avaliar a qualidade das amostras, segundo protocolo de GREER et al. (1991). As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo: tampão de reação 1X (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 2 µL de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 58° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72° C por 10 minutos.

4.9 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A análise dos produtos amplificados foi realizada em 100 mL de gel de agarose a 1,5% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE (Tris-borato a 0,045M e EDTA a 1mM, pH 8.0), submetido a uma voltagem constante de 6-7 V/cm e imerso em uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 60 minutos. Subsequentemente, o gel foi observado em transiluminador para visualização dos produtos amplificados, os quais foram comparados com um marcador de peso molecular com múltiplos fragmentos de 100 pares de bases (pb) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os 57 cães foram divididos em 3 grupos para cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica das reações de PCR e LAMP (PETRIE; WATSON, 1999):

- Grupo 1 (cães infectados por *B. canis*): composto por 18 cães positivos no teste de hemocultura.
- Grupo 2 (cães não infectados por *B. canis*): formado por 21 cães não utilizados com propósito de reprodução, com resultados negativos no teste de hemocultura, sem sinais clínicos ou evidências epidemiológicas de brucelose.
- Grupo 3 (cães suspeitos de brucelose): formado por 18 cães com resultados negativos no teste de hemocultura, porém sinais clínicos sugestivos de brucelose, ou contato com cães infectados por *B. canis*, ou contato com cães suspeitos de *B. canis*.

No caso dos cães que foram amostrados mais de uma vez, apenas os resultados da primeira amostragem foram utilizados para composição dos grupos 1, 2 e 3. Os grupos 1 e 2 foram empregados para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica, respectivamente. A sensibilidade diagnóstica também foi calculada no grupo 3.

As provas de diagnóstico empregadas também foram comparadas duas a duas, utilizando-se o Coeficiente *Kappa*, em que as concordâncias esperadas e observadas foram comparadas (COHEN, 1960; PETRIE; WATSON, 1999) e o teste de McNemar para avaliar a igualdade entre as proporções de positividade resultantes dos testes de diagnóstico (McNEMAR, 1947; PETRIE; WATSON, 1999). Foi utilizado um nível de significância de

5% de probabilidade. No caso das análises de concordância, as 98 amostras de sangue foram consideradas.

5 RESULTADOS

A PCR e a LAMP amplificaram com sucesso o DNA obtido de todas as espécies de *Brucella* spp. testadas e não houve amplificação de nenhuma das outras bactérias citadas no quadro 2. A reação de PCR foi capaz de detectar até 2,463 fg/ μ L de DNA da cepa de campo de *B. canis* e 27,11 fg/ μ L de DNA da cepa de referência de *B. canis*, diluídas em tampão TE e em DNA de sangue total obtido de canino não infectado. Já a reação de LAMP possibilitou a detecção de até 246,3 fg/ μ L de DNA da cepa de campo de *B. canis* e de 271,1 fg/ μ L de DNA obtido da cepa de referência de *B. canis*, diluídas em tampão TE e em DNA de sangue total obtido de canino não infectado.

O desempenho das técnicas de diagnóstico utilizadas comparadas duas a duas pelos testes estatísticos do Coeficiente Kappa e McNemar estão demonstrados na tabela 1.

Do total de 98 amostras testadas, 43 (43,87%) apresentaram resultado positivo na hemocultura, com isolamento de *B. canis*, 46 (46,93%) apresentaram resultado positivo na PCR e 16 (16,33%) apresentaram resultado positivo na técnica de LAMP. As 53 (54,08%) amostras com resultados negativos tanto na técnica de PCR quanto de LAMP apresentaram resultado positivo na PCR com gene interno codificador da β -actina.

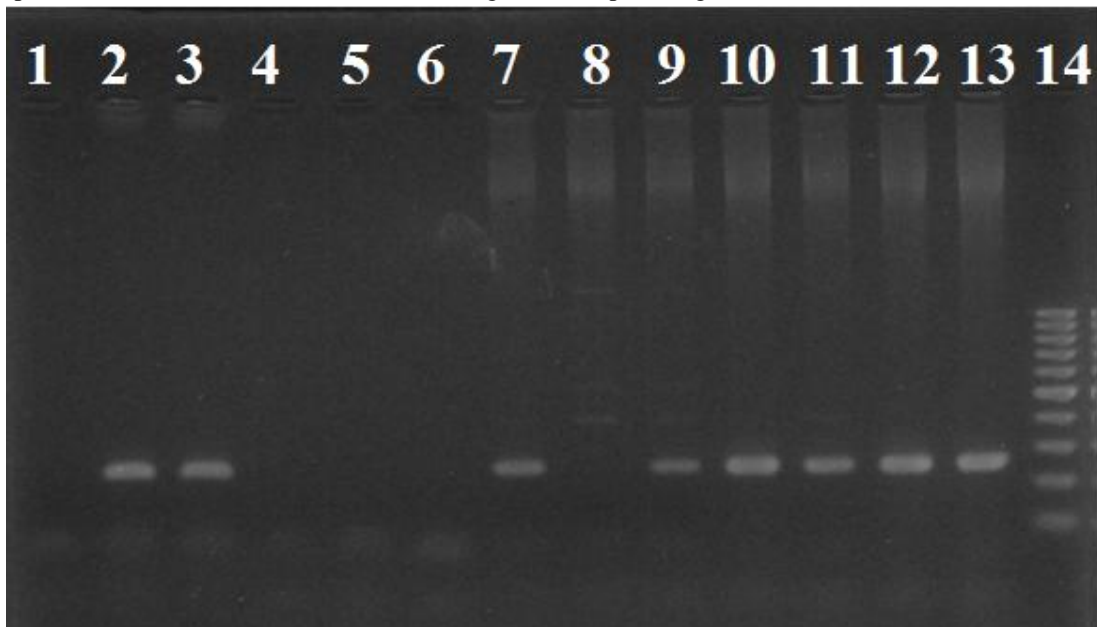
Dezoito dos 57 cães (31,57%) apresentaram resultado positivo na hemocultura em pelo menos uma amostra, sendo todos positivos na primeira coleta realizada, no caso dos animais amostrados mais de uma vez. Dentre os 18 positivos, um animal era não reprodutor com suspeita clínica de brucelose e 17 cães eram suspeitos e provenientes de canil comercial com histórico de abortamento e infertilidade. Dos 18 cães positivos, 13 eram fêmeas adultas, dois machos adultos e três filhotes fêmeas. Os demais animais avaliados apresentaram resultado negativo na hemocultura, sendo 15 machos e 24 fêmeas. Todos os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 2.

A sensibilidade dos testes de PCR e LAMP, considerando os animais do grupo 1, foi de 100% (18/18) e 44,44% (8/18), respectivamente. A especificidade dos testes de PCR e

LAMP, considerando os animais do grupo 2 foi de 95,23% (20/21) e 100% (21/21), respectivamente. Quanto aos animais do grupo três, 5,55% (1/18) foram positivos pela PCR e nenhum foi positivo pela LAMP.

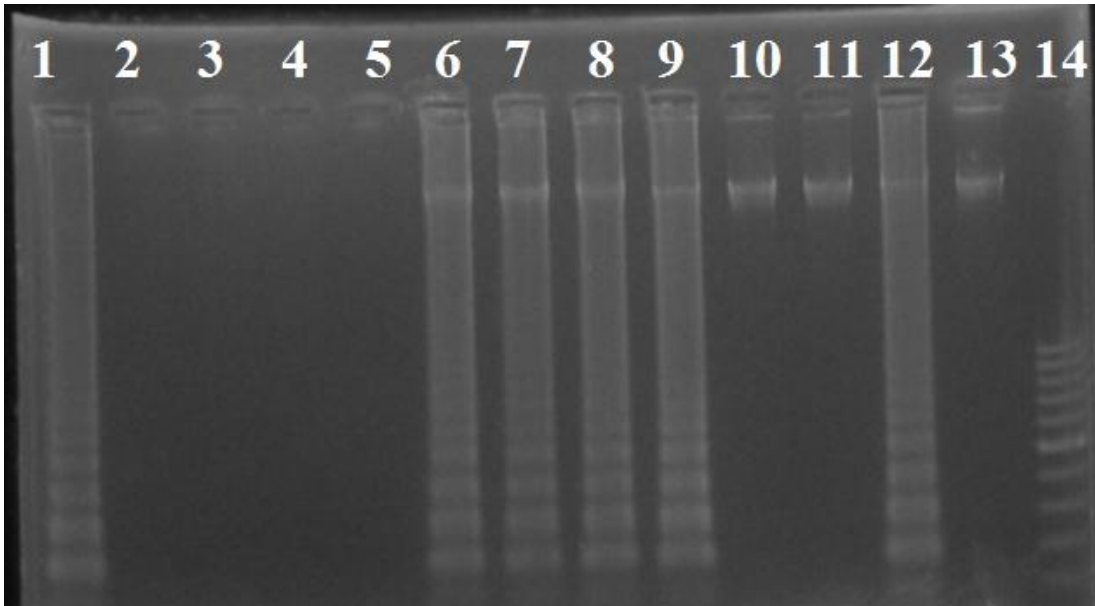
As figuras 2 e 3 ilustram resultados obtidos pelas técnicas moleculares de PCR e LAMP aplicadas às amostras de DNA obtidas de sangue canino, através da visualização em transiluminador do gel de agarose corado com brometo de etídio. As amostras positivas na técnica de PCR apresentaram um fragmento de DNA com tamanho de 238 pb.

Figura 2 – Resultado da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), com *primers IS711*, aplicada em amostras de DNA obtidas de sangue canino para diagnóstico de brucelose.



- 1 - Controle negativo de amplificação (água ultrapura)
- 2 - Controle positivo (DNA de cepa de campo de *B. canis*)
- 3 - Controle positivo (DNA de cepa da referência RM6/66 de *B. canis*)
- 4 - Controle negativo de extração 1 (Tampão TE)
- 5 - Controle negativo de extração 2 (Tampão TE)
- 6 - Controle negativo de extração 3 (Tampão TE)
- 7 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 116/14
- 8 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 112/14
- 9 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 111/14
- 10 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 45/15
- 11 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 18/15
- 12 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 14/15
- 13 - Amostra de DNA obtido de sangue canino 10/15
- 14 - Marcador de peso molecular de 100 pb

Figura 3 – Resultado da técnica da amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP), com *primers IS711*, aplicada em amostras de DNA obtidas de sangue canino para diagnóstico de brucelose



- 1- Controle positivo (DNA de cepa de campo de *B. canis*)
- 2- Controle negativo de amplificação (água ultrapura)
- 3- Controle negativo de extração 1 (Tampão TE)
- 4- Controle negativo de extração 2 (Tampão TE)
- 5- Controle negativo de extração 3 (Tampão TE)
- 6- Amostra de DNA obtido de sangue canino 45/15
- 7- Amostra de DNA obtido de sangue canino 14/15
- 8- Amostra de DNA obtido de sangue canino 10/15
- 9- Amostra de DNA obtido de sangue canino 116/14
- 10- Amostra de DNA obtido de sangue canino 112/14
- 11- Amostra de DNA obtido de sangue canino 111/14
- 12- Amostra de DNA obtido de sangue canino 14/14
- 13- Amostra de DNA obtido de sangue canino 13/14
- 14- Marcador de peso molecular de 100 pb

Tabela 1 – Desempenho das técnicas de hemocultura, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP), aplicadas em amostras de DNA obtidas de sangue total canino para diagnóstico de brucelose causada por *Brucella canis*, comparadas duas a duas pelos testes estatísticos de Kappa e McNemar (intervalo de confiança de 5%).

RESULTADOS DOS TESTES						CONCORDÂNCIA KAPPA		McNEMAR		
A	B	Positivo no teste A e positivo no teste B	Negativo no teste A e negativo no teste B	Positivo no teste A e negativo no teste B	Negativo no teste A e positivo no teste B	Valor de <i>Kappa</i>	Concordância	Valor do X^2	Valor de <i>p</i>	Similaridade entre as proporções de positivos
Hemocultura	PCR	42	51	1	4	0,8972	ótima	0,80	0,3711	sim
Hemocultura	LAMP	16	55	27	0	0,3995	razoável	25,04	0	não
PCR	LAMP	16	52	30	0	0,3614	razoável	28,03	0	não

6 DISCUSSÃO

A sequência de inserção *IS711*, comum a todas as espécies de *Brucella* e ausente em outros gêneros bacterianos, é uma região conservada e seus fragmentos estão inseridos em diferentes regiões da molécula de DNA, em número variado de cópias (HALLING; TATUM; BRICKER, 1993; OUAHRANI et al., 1993; OCAMPO-SOSA; GARCÍA-LOBO, 2008; BOUNAADJA et al., 2009; MANCILLA et al., 2011). Estas características a torna uma forte candidata para uso no desenho de *primers* por possibilitar o desenvolvimento de ensaios de amplificação com elevada especificidade e sensibilidade para detecção de *Brucella* spp., e assim facilitar o diagnóstico da brucelose. Contudo, a quantidade desses elementos móveis, dispostos ao longo do genoma, varia de acordo com cada espécie de *Brucella*, por consequência a eficiência dos *primers* para *IS711* poderá ser influenciada por essa particularidade. A sensibilidade analítica do teste de PCR apresentou melhor desempenho com a cepa de campo do que com a cepa de referência, uma vez que foram detectados até 2,463 fg/ μ L de DNA na cepa de campo e até 27,11 fg/ μ L na cepa de referência. Assim, os resultados indicam que a diferença no limiar de detecção entre as duas cepas foi de apenas 10 vezes, aproximadamente. As variações no protocolo de diluição e o método de pipetagem, que são variações laboratoriais, podem ser a razão da pequena diferença observada entre os valores de limiar de detecção, bem como a possibilidade de diferentes números de cópias de *IS711* presente entre as duas cepas, embora pertençam a mesma espécie. Os valores da sensibilidade analítica são semelhantes aos valores obtidos por Keid et al. (2007c) na aferição da sensibilidade analítica da PCR com *primers* direcionados a região interespacedora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*, que foi capaz de detectar até 3,8 fg do DNA de *Brucella*.

Zadon et al. (2015) testaram LAMP e PCR utilizando *primers* direcionados à *IS711* e verificaram que, a detecção limite de DNA foi de 7,5 pg pela PCR e 75 fg pela LAMP, evidenciando que o ensaio de LAMP apresentou maior sensibilidade analítica do que a técnica de PCR. Todavia, os resultados obtidos neste estudo são contrários aos de Zadon et al. (2015), pois a sensibilidade analítica da PCR foi maior que a da reação de LAMP, ao detectar até 2,463 fg/ μ L de DNA da cepa de campo de *B. canis* e até 27,11 fg/ μ L de DNA da cepa de referência, enquanto que a LAMP detectou até 246,3 fg/ μ L na cepa de campo e 271,1 fg/ μ L na cepa de referência. A PCR e a LAMP são testes baseados em diferentes princípios de

amplificação, diferentes enzimas e reagentes. Embora tenha sido usada a mesma região alvo *IS711* para desenho dos *primers*, resultados contraditórios em termos de sensibilidade analítica podem ser esperados, indicando que o processo de amplificação da PCR talvez seja mais eficiente. Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com os resultados de Zadon et al. (2015) nota-se que os limiares de detecção são bem distintos, embora ambos os trabalhos tenham utilizados *primers* direcionados à sequência de inserção *IS711*. A diferença de desempenho pode ser explicada pela escolha de distintas sequências de *primers* empregada em cada estudo, o que pode levar a desempenhos diferentes. Ainda que os mesmos pares de *primers* fossem utilizados, a verificação de diferentes desempenhos poderia ser evidenciada, pois as técnicas de amplificação de DNA estão sujeitas a variações em decorrência do uso de diferentes protocolos de extração, diferentes marcas de reagentes e equipamentos, o que dificulta a comparação dos resultados entre diferentes laboratórios (OIE, 2012).

Os resultados obtidos de especificidade analítica dos *primers* desenhados neste estudo enfatizam o potencial de uso dessa sequência de inserção em técnicas moleculares direcionadas ao diagnóstico. Na avaliação da especificidade analítica dos *primers IS711* desenhados para uso nas técnicas de PCR e de LAMP, nenhuma das cepas bacterianas não brucélicas foram amplificadas, esses dados corroboram com os estudos de Bounaadja et al. (2009) e Pérez-Sancho et al. (2013) que avaliaram o desempenho de *primers* direcionados à *IS711* pela técnica de PCR para detecção de *Brucella*.

A técnica de PCR com os *primers IS711* avaliados neste trabalho permitiu a detecção de uma proporção de amostras positivas similar à hemocultura, conforme verificado pelo teste de McNemar, e a concordância entre os dois testes foi ótima, de acordo com o coeficiente *Kappa*, ao analisar as 98 amostras de sangue canino. Apenas uma amostra apresentou resultado positivo na hemocultura e negativo na PCR, enquanto que quatro amostras foram negativas na hemocultura e positivas na PCR. Um resultado positivo pelo teste de hemocultura e negativo na PCR poderia ser explicado pela obtenção de um DNA de baixa qualidade devido à ação de inibidores na amostra (ABU AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2001) contudo essa amostra foi amplificada com sucesso pela reação de PCR para detecção do gene da β -actina. O desempenho da PCR também poderia ter sido influenciado pela presença de altas concentrações de DNA do hospedeiro, que também atuam como inibidores da amplificação durante a reação de PCR (COGSWELL et al., 1996; AMIN; HAMDY; IBRAHIM, 2001).

Já os resultados negativos na hemocultura e positivos na PCR podem ser justificados pelo potencial da PCR de não depender da presença de brucelas viáveis na amostra para que seja amplificado o DNA, corroborando com o fato de apresentar uma maior sensibilidade analítica. A hemocultura possivelmente necessite de uma quantidade maior de bactérias na amostra inicial para que a replicação bacteriana seja bem sucedida. Além disso, a reação de PCR não é inviabilizada pela interferência de contaminação secundária na amostra, enquanto que o cultivo microbiológico pode sofrer influência de contaminações secundárias inviabilizando o crescimento das colônias de *Brucella*. O teste de hemocultura utiliza meio líquido sem a adição de antibióticos para o isolamento de *Brucella*, que é uma bactéria de crescimento fastidioso, que leva de 7 a 10 dias para crescer, portanto um contaminante com capacidade de se sobrepor ao crescimento das brucelas, pode interferir no seu isolamento. As quatro amostras negativas na hemocultura, porém, não apresentaram contaminação secundária, assim a explicação mais plausível seria a presença de brucelas não viáveis ou em pequena quantidade (BRICKER, 2002; YANG; ROTHMAN, 2004).

Uma maior proporção de amostras positivas foi detectada pela hemocultura e também pela PCR em relação à LAMP, de acordo com o teste de McNemar. A concordância, de acordo com o coeficiente Kappa, entre os testes de hemocultura e LAMP, assim como entre a PCR e o teste de LAMP foi razoável. Nenhuma amostra foi positiva na LAMP e negativa na PCR ou na hemocultura, enquanto que das 98 amostras testadas, 30 foram negativas na LAMP e positivas na PCR e 27 foram negativas na LAMP e positivas na hemocultura. Esses resultados podem estar relacionados com a baixa sensibilidade analítica na LAMP quando comparada com a PCR, que conforme mencionado anteriormente, embora sejam técnicas moleculares, seus princípios de amplificação são distintos. Ao comparar as técnicas de PCR e LAMP, todas as amostras positivas na técnica de LAMP foram detectadas pela PCR, contudo o desempenho da LAMP neste teste comparativo não foi satisfatório.

A PCR avaliada no presente trabalho apresentou 100% de sensibilidade em relação à hemocultura, considerando-se os 18 cães infectados. Estes resultados indicam que o diagnóstico direto da brucelose canina também pode ser realizado através das técnicas moleculares que, quando comparadas com a hemocultura não demandam tanto tempo, são mais seguras e têm apresentado bom desempenho, tanto neste trabalho, quanto em estudos anteriores (KEID et al., 2007a,b,c; KANG et al., 2014; KAUFFMAN et al., 2014).

A sensibilidade da técnica de LAMP não foi satisfatória, possibilitando a detecção de apenas oito dos 18 cães infectados e positivos pela hemocultura. O baixo desempenho da técnica de LAMP quando comparada com a hemocultura pode estar relacionado com *primers IS711* que não foram capazes de detectar concentrações muito baixas de DNA, somado as características intrínsecas do teste de LAMP que difere da hemocultura quanto ao modelo de amplificação do patógeno.

No grupo dos animais classificados como suspeitos, uma única amostra apresentou resultado positivo na técnica de PCR, sendo que todos foram negativos pela técnica de LAMP. Esse resultado poderia estar relacionado à ocorrência de reação cruzada com outra cepa bacteriana similar às espécies do gênero *Brucella* ou comumente relatadas em infecções caninas e que não constam na lista de cepas bacterianas testadas com os *primers IS711* deste estudo. Na avaliação da especificidade analítica, os *primers* não amplificaram nenhuma das cepas bacterianas empregadas e quando analisados pelo programa Primer-Blast (YE et al., 2012) esses *primers* demonstraram ser específicos para amplificação de *Brucella*. Todavia a existe a possibilidade da reação cruzada com outros organismos que não foram avaliados nestas análises. A amostra positiva é oriunda de um cão macho reprodutor, mas que não apresentou sintomatologia clínica reprodutiva ou qualquer sinal clínico indicativo de brucelose canina, embora seja um cão classificado como suspeito por proceder de um canil com histórico de abortamento. Desse modo, a possibilidade deste animal estar realmente infectado não pode ser descartada, ainda que ele não tenha apresentado nenhum sinal clínico compatível com a brucelose. No grupo de cães infectados avaliados no estudo, quatro animais que apresentaram resultados positivos na hemocultura eram assintomáticos, corroborando com outros estudos que relataram a ocorrência de uma porcentagem significativa de cães infectados pela *B. canis* e assintomáticos (TAUL; POWELL; BAKER, 1967; UEDA et al., 1974a; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978; LUCERO et al., 2005b). Portanto, esse animal, pode ter apresentado bacteremia, contudo com uma carga bacteriana circulante baixa, não detectável pela hemocultura, mas passível de detecção pela reação de PCR com os *primers IS711*, que já demonstrou ser altamente sensível.

A especificidade diagnóstica do teste de PCR foi inferior à LAMP, uma vez que um dos animais pertencente ao grupo dos cães não infectados apresentou resultado positivo na PCR. O resultado positivo pode ser justificado pela ocorrência de uma reação cruzada com organismos geneticamente semelhantes à *Brucella* spp, porém, não avaliados quanto à especificidade analítica no presente trabalho. O critério adotado para a classificação dos cães

como não infectados baseou-se apenas num único teste negativo de hemocultura e na ausência de sinais clínicos. O animal com resultado positivo era um cão macho, de raça e não castrado, sendo um animal de estimação e não utilizado para reprodução. Devido à natureza crônica, persistente e assintomática da brucelose canina, existe a possibilidade deste animal ter sido realmente infectado sem demonstrar sinais clínicos, tendo sido detectado pela PCR em razão da sua alta sensibilidade, mas não pela hemocultura. Ademais, diversos cães podem nascer infectados por *B. canis* e permanecer assintomáticos por longo tempo, principalmente quando não são utilizados para reprodução (GYURANECZ et al., 2011).

Os resultados obtidos por Pérez-Sancho et al. (2013) com *primers IS711* em amostras teciduais de ovinos demonstraram equivalência nos resultados obtidos pelas técnicas de isolamento bacteriano, PCR e LAMP, ou seja as técnicas moleculares detectaram todas as amostras positivas pelo teste “padrão-ouro”. Contudo, no presente estudo a técnica de LAMP com *primers IS711* desenhados e testados em amostras de sangue total canino, não apresentou resultados satisfatórios que possam justificar a sua utilização no diagnóstico de brucelose canina.

A técnica de PCR, porém, apresentou um ótimo desempenho e pode ser aplicada como uma alternativa à técnica de hemocultura, que apesar de ser considerado o diagnóstico definitivo no caso da brucelose canina, demanda tempo e apresenta alto risco para os laboratoristas devido à manipulação de amostras de cultura microbiológica (ALTON et al., 1976; CORBEL et al., 2006; WALLACH et al., 2004; CARMICHAEL; GREENE, 2012). Em contrapartida, a PCR tem capacidade de amplificar amostras de DNA em um curto período de tempo e não apresenta risco à saúde pública, porém necessita de equipamentos sofisticados e reagentes de alto custo (YANG; ROTHMAN, 2004). Embora seja necessário o uso de termocicladores, centrífugas e reagentes de custo elevado, o diagnóstico de um cão suspeito pode ser disponibilizado em 2 a 3 dias, no caso do protocolo para PCR aplicado neste estudo, que inclui uma etapa de incubação *overnight*, durante o procedimento de extração. Para o teste de hemocultura, o custo de reagentes e equipamentos é inferior, entretanto o período total para obtenção do resultado é de no mínimo 10 a 15 dias, considerando-se o período compreendido entre o cultivo e a identificação das bactérias isoladas. Quanto mais demorado o diagnóstico, maiores as chances dos animais suspeitos transmitirem a infecção. Desse modo, em canis comerciais, onde um grande número de animais é usualmente mantido em contato próximo e nem sempre são verificadas condições adequadas para isolamento dos cães suspeitos enquanto se aguarda o resultado do diagnóstico laboratorial, um diagnóstico

mais rápido pela PCR provavelmente represente um maior benefício, apesar de seu custo mais elevado. Durante a fase de bacteremia, os cães são capazes de eliminar brucelas em grandes quantidades no ambiente, de maneira que a rápida identificação dos cães nesta condição é desejável para redução do potencial de transmissão da enfermidade (KEID et al., 2007a,b; UEDA et al., 1974a; SERIKAWA; MURAGUCHI; NAKAO, 1978).

7 CONCLUSÃO

A técnica de PCR com *primers* desenvolvidos para amplificação da sequência de inserção *IS711* demonstrou ser uma alternativa para o diagnóstico da brucelose canina quando aplicada em amostras de sangue, por ter apresentado elevados valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica, tendo potencial de ser utilizada como um teste substituto da hemocultura.

A técnica de LAMP com *primers* desenvolvidos para a sequência de inserção *IS711* não apresentou um desempenho satisfatório para que se possa ser utilizada como alternativa ou mesmo conjuntamente com a PCR e a hemocultura para o diagnóstico da brucelose canina empregando-se amostras de sangue total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUSSALAM, M.; FEIN, D. A. Brucellosis as a world problem. **Developments in biological standardization**, v. 31, p. 9-23, 1976.

ABU AL-SOUD, W.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 485-493, 2001.

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

ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na

cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGES, 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 Rural**, 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, A. G. Discospondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 24, n. 8, p. 249-252, 1983.

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

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W, LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.17, p. 3389-3402, 1997.

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.

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.

BARROUIN-MELO, S. M.; POESTER, F. P.; RIBEIRO, M. B.; ALCÂNTARA, A. C.; AGUIAR, P. H. P.; NASCIMENTO, I. L.; SCHAER, R. E.; NASCIMENTO, R. M.; FREIRE, S. M. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using na antigen obtained from wild *Brucella canis*. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 3, 340-346, 2007.

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

BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; HÉNAULT, S.; ZYGMUNT, M. S.; POLIAK, S.; GARIN-BASTUJI, B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of *IS711*, *bcs₃₁*, and *per* target genes. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. (1-2), p. 156-164, 2009.

- BRENNAN, S. J.; NGELEKA, M.; PHILIBERT, H. M.; FORBES, L. B.; ALLEN, A. L. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 7, p. 703-708, 2008.
- BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-446, 2002.
- BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **The Journal of Hygiene (Lond.)**, v. 54, n. 3, p. 351-364, 1956.
- CARMICHAEL, L. E. Abortions in 200 Beagles. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 8, p. 1126, 1966.
- CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, v. 6, n. (2-3), p. 105-116, 1976.
- CARMICHAEL, L. E.; BRUNER, D. W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **The Cornell Veterinary**, v. 48, n. 4, p. 579-592, 1968.
- CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 152, n. 6, p. 605-616, 1968.
- CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine brucellosis: the clinical, disease, pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1726-1734, 1970.
- 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. **The Cornell Veterinarian**, v. 77, n. 1, p. 3-12, 1987.
- CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **The Cornell Veterinarian**, v. 78, n. 1, p. 63-73, 1988.
- CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cat**. 4. ed. Missouri: Saunders, 2012, p. 398-411.
- CARVALHO, M. R.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; DIAS, H. L.; LIMA, E. S. C. Ocorrência da *Brucella canis* e *Brucella abortus* em cães criados no estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, n.34, p. 69-76, 2000.
- CASSATARO, J.; DELPINO, M. V.; VELIKOVSKY, C. A.; BRUNO, L.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Diagnostic usefulness of antibodies against ribosome recycling factor from *Brucella melitensis* in human or canine brucellosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 366-369, 2002.
- CAVALCANTI, L. A.; DASSO, M. G.; OLIVEIRA, F. C. S.; VIEGAS, S. A. R. A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALCANTARA, A. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; OLIVEIRA, E. M. D. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis*

em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.

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

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

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

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: FIRST INTERNACIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, 1997, Jerusalem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p.2, p. 213-221, 1997.

CORBEL, M. J.; WHO, World Health Organization.; FAO, Food and Agriculture Organisation of the United Nations.; OIE, World Organisation for Animal Health. Brucellosis in humans and animals, WHO Library, 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2016.

CORBEL, M. J.; BANAI, M. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Garrity, GM, editor. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2: The Proteobacteria: Part B. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 2005. p. 377-388.

CORRENTE, M.; FRANCHINI, D.; DECARO, N.; GRECO, G.; D'ABRAMO, M.; GRECO, M. F.; LATRONICO, F.; CROVACE, A.; MARTELLA, V. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. **The New Microbiologica**, v. 33, n. 4, p. 337-341, 2010.

CSFPH, The Center for Food Security and Public Health. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. Contagious Abortion, Undulant Fever, 2012. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf> Acesso em: 19 jan 2016.

DENTINGER, C. M.; JACOB, K.; LEE, V. L.; MENDEZ, H. A.; CHOTIKANATIS, K.; McDONOUGH, P. L.; CHICO, D. M.; DE, B. K.; TILLER, R. V.; TRAXLER, R. M.; CAMPAGNOLO, E. R.; SCHMITT, D.; GUERRA, M. A.; SLAVINSKI, S. A. Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 5, p. 407-414, 2012.

DE OLIVEIRA, M. Z.; VALE, V.; KEID, L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; BARROUIN-MELO, S. M. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis

of canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 3, p. 425-431, 2011.

DIAZ, R.; JONES, L. M.; WILSON, J. B. Antigenic relationship of the Gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough Brucellae. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 2, p. 618-624, 1968.

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

DREER, M. K. P.; GONÇALVES, D. D.; CAETANO, I. C. S.; GERÔNIMO, E.; MENEGAS, P. H.; BERGO, D.; LOPES-MORI, F. M. R.; BENITEZ, A.; FREITAS, J. C.; EVERS, F.; NAVARRO, I. T.; MARTINS, L. A. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 23, 2013.

ESCOBAR, G. I.; BOERI, E. J.; AYALA, S. M.; LUCERO, N. E. The feasibility of using antigens prepared with rough Brucella strains for diagnosis of canine brucellosis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 42, n. 1, p. 35-40, 2010.

FERNANDES, A. R. F.; AZEVEDO, S. S.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; GENOVEZ, M. E.; AZEVEDO, A. S.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1405-1408, 2011.

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

FERREIRA T.; MANDELBAUM, M. A.; MARQUES, A. P. L.; TORRES, H. M.; FIGUEIREDO, M. J.; SERRA, C. M. B.; AQUINO, M. H. C. Inquérito sorológico da brucelose canina através da utilização de antígeno externo e interno de *Brucella canis* e *Brucella ovis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 167-168, 2007.

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

FLORES-CASTRO, R.; CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis* infection in dogs: treatment trials. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 23, n. 2, p. 75-79, 1981.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688-2693, 2007.

- FRANCI, P.; DOTTO, G.; CATTAL, A.; PASOTTO, D. Lethal septic shock after dental scaling in a healthy dog due to *Ochrobactrum anthropi*-contaminated propofol. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 5, p. 345-347, 2015.
- GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, n. 7, p. 905-909, 1974.
- GEORGE, L. W.; DUNCAN, J. R.; CARMICHAEL, L. E. Semen examination in dogs with canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 11, p. 1589-1595, 1979.
- GLYNN, M. K.; LYNN, T. V. Brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 6, p. 900-908, 2008.
- GORDON, J.C.; PUE, H. L.; RUTGERS, H. C. Canine brucellosis in a household. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 7, p. 695-698, 1985.
- GREER, C. E.; PETERSON, S. L.; KIVIAT, N. B.; MANOS, M. M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. **American Journal of Clinical Pathology**, v.95, n. 2, p. 117-124, 1991.
- GYURANECZ, M.; SZEREDI, L.; RÓNAI, Z.; DÉNES, B.; DENCSE, L.; DÁN, A.; PÁLMAI, N.; HAUSER, Z.; LAMI, E.; MAKRAI, L.; ERDÉLYI, K.; JÁNOSI, S. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.1, p. 143-147, 2011.
- HALL, J. A. BioEdit: a user-friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HALLING, S. M.; TATUM, F. M.; BRICKER, B. J. Sequence and characterization of an insertion sequence, *IS711*, from *Brucella ovis*. **Gene**, v. 133, p. 123-127, 1993.
- HALLING, S. M.; ZEHR, E. S. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6637-6640, 1990.
- HOFER, E.; BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; MELZER, F.; TOMASO, H. LÓPEZ-GOÑI, I.; FASCHING, G.; SCHMOLL, F. First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. **New Microbiologica**, v. 35, p. 507-510, 2012.
- HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, p. 575-587, 2006.
- HOLST, B. S.; LÖFGVIST, K.; ERNHOLM, L.; ELD, K.; CEDERSMYG, M.; HALLGREN, G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v, 54, n.1, p. 18, 2012.

ILRI, Internacional Livestock Research Institute. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. Zoonoses Project 4. Report to Department for International Development, UK, 2012. Disponível em: <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/21161/ZooMap_July2012_final.pdf> Acesso em: 12 dez. 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Plano Nacional de Saúde, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>> Acesso em: 07 abr. 2016.

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 the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 11, p. 1330-1333, 1982.

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. 625-630, 1968.

KANG, S-I.; LEE, S-E.; KIM, J-Y.; LEE, K.; KIM, J-W.; LEE, H-K.; SUNG, S-R.; HEO, Y-R.; JUNG, S. C.; HER, M. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 237-241, 2014.

KANG, S-I.; HER, M.; KIM, J-Y.; LEE, J. J.; LEE, K.; SUNG, S-R.; JUNG, S. C. Rapid and specific identification of *Brucella abortus* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40: 1-6, 2015.

KAUFFMAN, L. K.; BJORK, J. K.; GALLUP, J. M.; BOGGIATTO, P. M.; BELLAIRE, B. H.; PETERSEN, C. A. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 1, p. 48-54, 2014.

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, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 161-166, 2004.

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

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, p. 1203-1210, 2007b.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, p. 951-965, 2007c.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 22-26, 2009.

KEID, L. B.; DINIZ, J. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M. Evaluation of an immunochromatographic test to the diagnosis of canine brucellosis caused by *Brucella canis*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 939-944, 2015.

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 the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 8, p. 1253-1257, 1992.

KIM, J. W.; LEE, Y. J.; HAN, M. Y.; BAE, D. H.; JUNG, S. C.; OH, J. S.; HA, G. W.; CHO, B. K. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1103-1107, 2007.

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

KRUEGER, W. S.; LUCERO, N. E.; BROWER, A.; HEIL, G. L.; GRAY, G. C. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 7, p. 509-518, 2014.

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

LAWACZECK, E.; TOPOREK, J.; CWIKLA, J.; MATHISON, B. A. *Brucella canis* in a HIV-infected patient. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 2, p. 150-152, 2011.

LEDBETTER, E. C.; LANDRY, M. P.; STOKOL, T.; KERN, T. J.; MESSICK, J. B. *Brucella canis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis, and treatment. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 3, p. 183-191, 2009.

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

- LIN, G-Z.; ZHENG, F-Y.; ZHOU, J-Z.; GONG, X-W.; WANG, G-H.; CAO, X-A.; QIU, C-Q. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *omp25* gene for rapid detection of *Brucella* spp. **Molecular and Cellular Probes**, 25, n. 2-3, p. 126-129, 2011.
- LÓPEZ, G.; AYALA, S. M.; EFRON, A. M.; GÓMEZ, C. F.; LUCERO, N. E. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 41, n. 2, p. 97-101, 2009.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 152-155, 2011.
- LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; LOPEZ, G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 656-660, 2002.
- LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; JACOB, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 457-461, 2005a.
- LUCERO, N. E.; JACOB, N. O.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; TUCCILLO, P.; JACQUES, I. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 505-508, 2005b.
- LUCERO, N. E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M. N.; REYNES, E.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; AYALA, S. M. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 2, p. 280-285, 2010a.
- LUCERO, N. E.; MALDONADO, P. L.; KAUFMAN, S.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; JACOB, N. R. *Brucella canis* causing infection in an HIV-infected patient. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 5, p. 527-529, 2010b.
- MACHADO, M. A.; SOLER, N. B.; FREITAS, J. C. Porcentagem de cães soropositivos para *Brucella canis* apresentando problemas reprodutivos atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 3, p. 161-168, 2013.
- MALEK DOS REIS, C. B.; HOFFMAN, R. C.; SANTOS, R. S.; TURRI, R. J. G.; ORIANI M. R. G. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães errantes da cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo, Brasil (2002-2003). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 32-34, 2008.
- MANCILLA, M.; ULLOA, M.; GOÑI-LÓPEZ, I.; MORIYÓN, I.; ZÁRRAGA, A. M. Identification of new *IS711* insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 167, p. 1-6, 2011.

- MANIAS, V.; NAGEL, A.; MOLLERACH, A.; MENDOSA, M. A.; FREYRE, H.; GÓMEZ, A.; FERRARA, E.; VAY, C.; MENDEZ, E. L. A. *Brucella canis* endocarditis: first documented case in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 1, p. 50-53, 2013.
- MAKLOSKI, C. L. Canine Brucellosis Management. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 1209-1219, 2011.
- MARZETTI, S.; CARRANZA, C.; RONCALLO, M.; ESCOBAR, G. I.; LUCERO, N. E. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 55-61, 2013.
- MASCOLLI, R.; SOTO, R. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; PINHEIRO, S.R.; GUILLOUX, A. G. A.; AZEVEDO, S. S.; FERNANDES, A. R. F.; KEID, L. B.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose e brucelose na população canina da Estância Turística de Ibiuná, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.
- MATEO-DE-ANTONIO, E. M.; MARTÍN, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 54, n. 7, p. 1043-1046, 1993.
- MATEO-DE-ANTONIO, E. M.; MARTÍN, 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.
- McDERMOTT, J.; GRACE, D.; ZINSSTAG, J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. **Revue scientifique et technique (International Office Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 249-261, 2013.
- McNEMAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. **Psychometrika**, v. 12, n. 2, p. 153-157, 1947.
- MEYER, K. F.; SHAW, E. B. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies of the genus *Brucella* nov. gen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 173-184, 1920.
- MOORE, J. A. *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 12, p. 2034-2037, 1969.
- MOORE, J. A.; BENNETT, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion. **The Veterinary Record**, v. 80 n. 20, p. 604-605, 1967.
- MOORE, J. A.; KAKUK, T. J. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 8, p. 1352-1358, 1969.

- MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**: v. 15, n. 2, p. 62-69, 2009.
- MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. **Journal of Infectious and Chemotherapy**, v. 19, n. 3, p. 404-411, 2013.
- MORIYÓN, I.; GAMAZO, C.; DÍAZ, R. Properties of the outer membrane of *Brucella*. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 138, n.1, p. 89-91, 1987.
- MOSALLANEJAD, B.; GHOBANPOOR, N. M.; AVIZEH, R. MOHAMMADIAN, N. A serological survey on *Brucella canis* in companion dogs in Ahvaz. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 10, n. 4, p. 383-386, 2009.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n.4, p. 56-61, 64-65, 1990.
- MUNFORD, R. S.; WEAVER, R. E.; PATTON, C.; FEELEY, J. C.; FELDMAN, R. A. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemic study of two cases. **The Journal of the American Medical Association**, v. 231, n. 12, p. 1267-1269, 1975.
- MYERS, D. M.; VARELA-DIAZ, V. M.; COLTORTI, E. A. Comparative sensitivity of gel diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1974.
- NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop *primers*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 3, p. 223-229, 2002.
- NASPHV, National Association of State Public Health Veterinarians. Public Health Implications of *Brucella canis* infections in Humans. Summary Findings and Recommendations of the *Brucella canis* Workgroup, 2012. Disponível em: <<http://nasphv.org/Documents/BrucellaCanisInHumans.pdf>> Acesso em: 19 jan. 2016.
- 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.
- NJIRU, Z. K. Loop-mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6: e1572, 2012.
- NOMURA, A.; IMAOKA, K.; IMANISHI, H.; SHIMIZU, H.; NAGURA, F.; MAEDA, A.; TOMINO, T.; FUJITA, Y.; KIMURA, M.; STEIN, G. Human *Brucella canis* infections diagnosed by blood culture. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1183-1185, 2010.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, e63, 2000.

NOTOMI, T.; MORI, Y.; TOMITA, N.; KANDA, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features and future prospects. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 53, n. 1, p. 1-5, 2015.

OCAMPO-SOSA, A. A.; GARCÍA-LOBO, J. M. Demonstration of *IS711* transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 17, p. 1-10, 2008.

OHTSUKI, R.; KAWAMOTO, K.; KATO, Y.; SHAH, M. M.; EZAKI, T.; MAKINO, S. I. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1815-1823, 2008.

OIE, World Organisation for Animal Health. Bovine Brucellosis, Chapter 2.4.3. [Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009]. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, 2012. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf> Acesso em: 10 jan. 2016.

OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; WIDADA, J.S.; BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J. P. Identification and sequence analysis of *IS6501*, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of *IS6501* copies. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 12, p. 3265-3273, 1993.

PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANO, E. V. The new global map of human brucellosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 91-99, 2006.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; MORITA, K. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008.

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

PÉREZ-SANCHO, M.; GARCÍA-SECO, T.; ARROGANTE, L.; GARCÍA, N.; MARTÍNEZ, I.; DIEZ-GUERRIER, A.; PERALES, A.; GOYACHE, J.; DOMÍNGUEZ, L. ÁLVARES, J. Development and evaluation of an *IS711*-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 489-494, 2013.

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

PIAMPIANO, P.; McLEARY, M.; YOUNG, L. W.; JANNER, D. Brucellosis: unusual presentations in two adolescents boys. **Pediatric Radiology**, v. 30, n. 5, p. 355-357, 2000.

PICKERILL, P. A.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 160, n. 12, p. 1607-1615, 1972.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MULLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. F. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61 n. 1, p. 1-5, 2009.

POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L. E.; YU, W. L. Diagnosis of brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 46-60, 2010.

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.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K. **Concise Review of Veterinary Microbiology**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003. 153 p.

ROCCA, M. P. **Pesquisa de infecção por *Brucella* spp. em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre, procedentes da reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROXO, E.; PINHEIRO, S. R.; BRANDÃO, M. M.; AGUIAR, J. A.; GOUVÊA, G.; PIORUS, M. L.; LIMA, M. A. B. Brucelose canina: relato de uma possível transmissão de *Brucella canis* ao homem a partir de uma cadela da raça Doberman. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 55, n. 19, p. 11-13, 1990.

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.

SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 39, n. 2, p. 181-185, 1977.

SAHARAN, P.; DHINGOLIA, S.; KHATRI, P.; DUHAN, J. S.; GAHLAWAT, S. K. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 19, p. 1920-1928, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.

SANTANA, J. A.; DORNELES, E. M. S.; JAYME, V. S.; GALVÃO, S. R.; MINHARRO, S.; SANTOS, H.; MATHIAS, L. A.; DASSO, M. G.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Risk factors and presence of antibodies to *Brucella canis* and smooth *Brucella* in dogs from the

municipality of Araguaína, Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2951-2956, 2013.

SAYAN, M.; ERDENLIG, S.; STACK, J.; KILIC, S.; GUDUCUOGLU, H. S.; AKSOY, Y.; BAKLAN, A.; ETILER, N. A serological diagnostic survey for *Brucella canis* infection in Turkish patients with Brucellosis-like symptoms. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 6, p. 516-519, 2011.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; KRUGER, M.; LODRI, C. PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1316-1317, 2008a.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375–382, 2008b.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRUGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Australia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60 (Pt 4), p.801–808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S.; HAMMERI, J. A.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; VERGNAUD, G.; WITTE, A.; AISTLEITNER, K.; HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2090-2098, 2016a.

SCHOLZ, H. C.; MÜHLDOFER, K.; SHILTON, C.; SURESH, B.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; EISENBERG, T. Worldwide emergence of genetically diverse *Brucella* isolates in exotic frogs provides insights into *Brucella* evolution. **PLoS One**, v. 30, n. 11(12), 2016b.

SELEEN, N. M.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140 p. 392-398, 2010.

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

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

SERIKAWA, T.; KONDO, Y.; TAKADA, H.; YAMADA, J. Head-to-head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, n. 1, p. 41-48, 1984a.

SERIKAWA, T.; TAKADA, H.; KONDO, Y.; MURAGUCHI, T.; YAMADA, J. Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. **Developments in Biological Standardization**, v. 56, p. 295-305, 1984b.

SHOEBE, 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.

SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; CHANDLER, M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 865-891, 2014.

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

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.

SOLEIMANI, M.; SHAMS, S.; MAJIDZADEH-A, K. Developing a real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification assay as a rapid and accurate method for detection of Brucellosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 828-834, 2013.

SOLOAGA, R.; SALINAS, A.; POTERHALLO, M.; MARGARI, A.; SUAR, B.; LUCERO, N.; TURCOS, M.; PROCOPIO, A.; ALMUZARA, M. Bacteremia by *Brucella canis*. Isolation with the Bact-Alert system. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 36, n. 2, p. 81-84, 2004.

SONG, L.; LI, J.; HOU, S.; LI, X.; CHEN, S. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. **Journal of Microbiology Methods**, v. 90, n. 3, p. 292-297, 2012.

- SPINK, W. W.; MORISSET, R. Epidemic canine brucellosis due to a new species: *Brucella canis*. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 81, n. 43-50, 1970.
- STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, 1957.
- 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.
- TAUL, L. K.; POWELL, H. S.; BAKER, O. E. Canine abortion due to an unclassified gram-negative bacterium. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 62, n. 6, p. 543-544, 1967.
- TERAKADO, N.; UEDA, H.; SUGAWARA, H.; ISAYAMA, Y. Drug susceptibility of *Brucella canis* isolated from dogs. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, n. 3, p. 291-295, 1978.
- THOMAS, W. B. Diskospondylitis and other vertebral infections. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 30, n. 1, p. 169-182, 2000.
- TOMITA, N.; MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 887-882, 2008.
- TOSI, M. F.; NELSON, T. J.; *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam. **The Journal of Pediatrics**, v. 101, n. 5, p. 725-727, 1982.
- TRANGONI, M. D.; GIOFFRÉ, A. K. CUCCHI, M. E. C.; CAIMI, K. C.; RUYBAL, P.; ZUMÁRRAGA, M. J.; CRAVERO, S. L. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 619-626, 2015.
- TRAUM, J. Annual Report to the Chief of the Bureau of Animal Industry, Year Ending June 30, 1914. USDA Bureau of Animal Industry, p. 30.
- UEDA, K.; MAGARIBUCHI, T.; SAEGUSA, J.; URANO, T.; ITOH, K.; KIUCHI, Y.; FUJIWARA, K. Spontaneous *Brucella canis* infection in Beagles: bacteriological and serological studies. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 5, p. 381-389, 1974a.
- UEDA, K.; SAEGUSA, J.; FUJIWARA, K.; MUTO, S.; OKADA, K.; HASEGAWA, A.; SAEGUSA, S.; USUI, K. Detection of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 36, n. 6, p. 539-542, 1974b.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n.15, e115, 2012.

VASCONCELOS, R. T. J.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, F. A. L.; BATISTA, C. S. A.; BERNARDI, F.; SOTO, F. R. M.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 436-442, 2008.

WALLACH, J.C.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; BALDI, P.C.; FOSSATI, C.A. Human Infection with M- Strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p. 146-148, 2004.

WANG, Y.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; BAI, L.; ZHAO, Y.; LIU, C.; MA, A.; YU, H. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials**, v. 13, n. 31, 2014.

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.

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

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1573-1578, 2006.

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

WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H.C; DICK, E. J. JR.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, (Pt 12), p. 4120-4128, 2014.

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

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADEN, T.L. Primer- BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

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

YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 306-313, 2010.

ZADON, S.; SHARMA, N.S.; ARORA, A. K.; CHANDRA, M. Development of the novel loop mediated isothermal amplification (LAMP) of *IS711* sequence for rapid detection of *Brucella* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 2, p. 685-691, 2015.

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

ZOHA, S. J.; WALSH, R. Effect of a two-stage antibiotic treatment regimen on dogs naturally infected with *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, n. 12, p. 1474-1475, 1982.

Tabela 2 - Resultados das técnicas de hemocultura, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP) para diagnóstico da brucelose canina

(continua)

Número do animal	Número da amostra	Data coleta	Sexo	Hemocultura	PCR IS711	LAMP IS711	PCR β -actina	Sinais clínicos
1	19/14	22/03/2014	M	1	1	0	NR	0
2	22/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	48/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	0
	209/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0
3	17/14	22/03/2014	F	1	1	1	NR	1
	84/14	02/08/2014	F	1	0	0	1	1
	12/15	21/02/2015	F	1	1	0	NR	0
	43/15	29/03/2015	F	1	1	0	NR	0
	204/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0
4	9/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	76/14	02/08/2014	F	1	1	0	NR	0
	110/14	08/11/2014	F	1	1	0	NR	1
	13/15	21/02/2015	F	1	1	0	NR	0
	44/15	29/03/2015	F	1	1	0	NR	0
	205/15	24/05/2015	F	1	1	0	NR	0
5	77/14	02/08/2014	F	1	1	1	NR	1
	111/14	08/11/2014	F	1	1	0	NR	1
	50/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	0
6	18/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	83/14	02/08/2014	F	1	1	0	NR	1
	117/14	08/11/2014	F	1	1	1	NR	1
	18/15	21/02/2015	F	1	1	0	NR	0
	49/15	29/03/2015	F	1	1	0	NR	0
	210/15	24/05/2015	F	1	1	0	NR	0
7	16/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	82/14	02/08/2014	F	1	1	0	NR	0
	116/14	08/11/2014	F	1	1	1	NR	1
	10/15	21/02/2015	F	1	1	1	NR	0
	41/15	29/03/2015	F	1	1	0	NR	0
	202/15	24/05/2015	F	1	1	0	NR	0
8	21/14	22/03/2014	F	1	1	1	NR	1
	46/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	0
	207/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0
9	7/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	112/14	08/11/2014	F	0	0	0	1	1
	47/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	0
	208/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0

(continuação)

Número do animal	Número da amostra	Data coleta	Sexo	Hemocultura	PCR IS711	LAMP IS711	PCR β -actina	Sinais clínicos
10	6/14	22/03/2014	F	1	1	1	NR	1
	73/14	02/08/2014	F	1	1	1	NR	0
	42/15	29/03/2015	F	0	1	0	1	0
	203/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0
11	13/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	51/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	0
	212/15	24/05/2015	F	0	0	0	1	0
12	10/14	22/03/2014	F	1	1	1	NR	1
	75/14	02/08/2014	F	1	1	1	NR	0
	14/15	21/02/2015	F	1	1	1	NR	1
	45/15	29/03/2015	F	1	1	1	NR	0
	206/15	24/05/2015	F	1	1	1	NR	0
13	20/14	22/03/2014	F	1	1	0	NR	1
	52/15	29/03/2015	F	0	0	0	1	1
	213/15	24/05/2015	F	0	1	0	NR	1
14	14/14	22/03/2014	F	1	1	1	NR	1
	81/14	02/08/2014	F	1	1	0	NR	1
15	26/15	21/02/2015	F	1	1	0	NR	0
16	30/15	21/02/2015	F	1	1	1	NR	0
17	39/15	21/02/2015	F	1	1	1	NR	0
18	01/14	12/03/2014	M	0	0	0	1	0
19	02/14	12/03/2014	F	0	0	0	1	0
20	02/14	12/03/2014	F	0	0	0	1	0
21	04/14	12/03/2014	F	0	0	0	1	0
22	05/14	12/03/2014	M	0	0	0	1	0
23	226/15	26/05/2015	F	0	0	0	1	0
24	227/15	26/05/2015	F	0	0	0	1	0
25	228/15	26/05/2015	F	0	0	0	1	0
26	229/15	26/05/2015	F	0	0	0	1	0
27	230/15	26/05/2015	M	0	0	0	1	0
28	231/15	23/06/2015	F	0	0	0	1	0
29	232/15	23/06/2015	F	0	0	0	1	0
30	233/15	23/06/2015	M	0	0	0	1	0
31	234/15	23/06/2015	M	0	1	0	NR	0
32	235/15	23/06/2015	F	0	0	0	1	0
33	236/15	10/07/2015	F	0	0	0	1	0
34	237/15	10/07/2015	F	0	0	0	1	0
35	272/15	27/08/2015	M	C	0	0	1	0
36	273/15	27/08/2015	F	0	0	0	1	0

(conclusão)

Número do animal	Número da amostra	Data coleta	Sexo	Hemocultura	PCR IS711	LAMP IS711	PCR β -actina	Sinais clínicos
37	274/15	27/08/2015	M	0	0	0	1	0
38	006/16	12/02/2016	F	0	0	0	1	1
39	007/16	25/02/2016	M	0	0	0	1	1
40	011/16	29/06/2016	M	0	0	0	1	0
41	012/16	29/06/2016	M	0	1	0	NR	0
42	013/16	29/06/2016	M	0	0	0	1	0
43	014/16	29/06/2016	M	0	0	0	1	0
44	016/16	29/06/2016	M	0	0	0	1	0
45	017/16	29/06/2016	M	0	0	0	1	0
46	019/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
47	021/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
48	022/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
49	023/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
50	024/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
51	026/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
52	028/16	29/06/2016	F	0	0	0	1	0
53	97/16	02/07/2016	M	0	0	0	1	0
54	098/16	18/09/2016	M	1	1	0	NR	1
	161/16	31/10/2016	M	0	0	0	1	0
55	158/16	17/10/2016	F	0	0	0	1	0
56	159/16	17/10/2016	F	0	0	0	1	0
57	160/16	17/10/2016	F	0	0	0	1	0
Total				43	46	16	53	27

NR: Não realizado

M: Macho

F: Fêmea

IS711: sequência de inserção IS711

(0): Resultado negativo

(1): Resultado positivo

(c): Contaminação bacteriana secundária