

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

***Brucella canis*: SUA IMPORTÂNCIA NO BRASIL**

PAULA MILANO HESPANHOL

PORTO ALEGRE

2013/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

***Brucella canis*: SUA IMPORTÂNCIA NO BRASIL**

Autor: Paula Milano Hespanhol

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Pereira Gomes

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Pacheco de
Araújo

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para obtenção da Graduação em
Medicina Veterinária

PORTO ALEGRE

2013/1

RESUMO

A brucelose canina é uma doença importante para a clínica de pequenos animais, sendo prevalente, cosmopolita e subdiagnosticada no Brasil. Além de ser uma enfermidade infectocontagiosa para caninos, ela é uma zoonose e, por isso, risco à saúde pública humana. Além da *Brucella canis*, principal espécie rugosa causadora da brucelose canina, outras espécies lisas do gênero *Brucella* tais como a *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus* e, estão historicamente associadas às infecções humanas. A infecção humana pode ocorrer pelo contato direto com tecidos animais contaminados, assim como através de aerossol e fômites. Na maioria das vezes ela é assintomática, mas pode haver complicações como linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, ocasionalmente artrites e complicações incluindo meningites, endocardites e osteomielites. No homem, quando há sinais clínicos, os mais frequentemente são febre, anorexia, fraqueza e dores de cabeça. Infecções mais severas estão geralmente associadas a pacientes imunocomprometidos. A dificuldade no diagnóstico clínico pode ser atribuída aos sinais clínicos pouco evidentes ou ausentes, sendo importante a aplicação de testes laboratoriais incluindo o isolamento e identificação do agente etiológico aplicação de testes sorológicos e moleculares.

Palavras chave: *Brucella canis*; brucelose; brucelose canina; zoonose.

ABSTRACT

*Canine Brucellosis is an important disease to the clinic for small animals, being prevalent, cosmopolitan and underdiagnosed in Brazil. Besides being an infectious disease for dogs, it is a zoonosis and therefore risk to human public health. Besides *Brucella canis* main species causing the rough canine brucellosis, other species of the genus *Brucella* smooth such as *B. melitensis*, *B.* and *B. suis abortus*, and are historically associated with human infections. Human infection can occur by direct contact with infected animal tissues, as well as by aerosol and fomites. Most often it is asymptomatic, but there may be complications such as lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, and occasionally arthritis complications including meningitis, endocarditis and osteomyelitis. In man, when there are clinical signs, the most common are fever, anorexia, weakness and headaches. More severe infections are often associated with immunocompromised patients. The difficulty in clinical diagnosis can be attributed to few obvious clinical signs or absent, it is important to the application of laboratory tests including the isolation and identification of the etiologic agent application of serological and molecular tests.*

Keywords: *Brucella canis; brucellosis; canine brucellosis; zoonosis*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	AGENTE	7
3	HOSPEDEIRO.....	8
3.1	Homem	8
3.2	Cão	10
3.3	Outros	12
4	PATOGENIA	14
5	DIAGNÓSTICO	16
5.1	Clínico	16
5.2	Bacteriológico	17
5.2.1	Amostras de placenta e tecidos fetais	18
5.2.2	Amostra de sêmen	18
5.2.3	Amostras de urina	18
5.2.4	Outras	19
5.3	Sorológico	19
5.3.1	Soroaglutinação rápida (SAR)	20
5.3.2	Soroaglutinação lenta (SAL)	21
5.3.3	Imunodifusão em gel agarose (IDGA)	22
5.3.4	Reação de Fixação de Complemento (CFT)	26
5.3.5	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	26
5.3.6	Outros	28
5.4	Molecular	28
5.4.1	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	28
6	TRATAMENTO E PROFILAXIA	30
7	DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A brucelose causada pela *Brucella canis* é uma doença infectocontagiosa, considerada antroponose com distribuição mundial. Nos cães, a infecção é normalmente assintomática e mais raramente está associada à problemas reprodutivos, incluindo abortamento, falhas na concepção, prostatites, orquites e epididimites. As complicações derivadas dessa infecção, como artrites, discospondilites, meningites e encefalites são muito menos frequentes. A cronicidade da doença ocorre com frequência e é caracterizada por bacteremia intermitente. A principal forma de transmissão nos animais é venérea e/ou pelo contato direto com animais infectados. No homem, a principal forma de transmissão é através mucosa oronasal e por contato direto com secreção contaminada. As consequências da infecção são menos conhecidas, mas há relatos de complicações severas em pacientes imunocomprometidos.

A brucelose canina apresenta importância devido à sua elevada frequência de ocorrência, principalmente em canis comerciais. Uma vez que a infecção se estabelece em populações confinadas, sua disseminação ocorre rapidamente acometendo um elevado número de animais e causando problemas econômicos decorrentes das perdas reprodutivas.

O primeiro isolamento da *Brucella canis* ocorreu em 1966, por CARMICHAEL, nos Estados Unidos, durante uma investigação sobre a causa de abortos em cães da raça Beagle. No Brasil, os primeiros relatos ocorreram simultaneamente em São Paulo e no Rio Grande do Sul, em 1976. Hoje, há relatos de isolamento do agente de reprodutores a partir de vários tipos de amostras, como sangue, urina, sêmen e swab vaginal e medula óssea. Várias raças foram associadas à infecção, entretanto não há correlação direta com esse fator. No Brasil há estimativas que detectaram alta prevalência da infecção em diversas regiões do país e provenientes de populações de cães errantes, de clínicas veterinárias particulares, de animais domiciliados no meio rural e urbano, demonstrando que o risco de infecção é mais frequentemente associado aos canis comerciais, mas ela também está disseminada em populações de diversas origens e portanto risco a infecção humana.

Inquéritos epidemiológicos alertam para a necessidade de se impedir a entrada e permanência do agente em um plantel, pela identificação precoce de animais infectados, diminuindo o risco às populações expostas.

O diagnóstico laboratorial da brucelose canina está baseado na aplicação de técnicas diretas e indiretas as quais devem ser aplicadas nos animais com sinais clínicos ou com evidências epidemiológicas sugestivas de brucelose canina. O inquérito epidemiológico

constitui ferramenta importante na obtenção de dados que são estimativas da prevalência e base na aplicação de medidas de controle e prevenção da brucelose canina. Nos canis com a infecção brucélica, a rápida identificação e agilidade na tomada de decisão sobre o destino dos infectados é fundamental na disseminação entre hospedeiros naturais. Além disso, a realização de testes laboratoriais nos animais a serem introduzidos em populações confinadas constitui medida preventiva indispensável.

O diagnóstico clínico da brucelose canina apresenta inúmeras dificuldades, especialmente pela relação complexa do agente com o hospedeiro, traduzida pela assintomatologia e inespecificidade dos sinais clínicos. Além disso, a falta de testes diagnósticos confiáveis e de antígenos específicos disponíveis possibilita a ocorrência de reações cruzadas tornando o diagnóstico laboratorial complexo e caro.

A esterilização dos reprodutores caninos está indicada como medida principal no tratamento e profilaxia da brucelose canina e tem como objetivo reduzir, principalmente, a transmissão venérea. Entretanto outras medidas como a terapia antimicrobiana, manejo sanitário e monitoramento sorológico podem, em muito, auxiliar a eficácia do tratamento, mesmo sendo difícil a eliminação do agente nos caninos.

2 AGENTE

Brucella canis é uma bactéria intracelular pequena, de morfologia colonial rugosa e Gram negativa. Ela pertence ao gênero *Brucella*, que é composto de outras nove espécies hoje conhecidas: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. pinnipedialis*.

Evidências genéticas e imunológicas sugerem que as espécies estão intimamente relacionadas e levantam a hipótese de que o gênero seria composto por uma única espécie, *Brucella melitensis* e seus biovars. Assim, a *Brucella canis* seria considerada *Brucella melitensis* biovar *canis* (MORENO, *et al.*, 2002; WHATMORE, 2009) No entanto, a classificação recomendada pelo subcomitê de *Brucella* mantém a classificação do gênero e espécies conhecidas tradicionalmente. (INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROCARYOTES: SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF *Brucella*)

A *B. canis* e a *B. ovis* possuem morfologia colonial permanentemente rugosa, não tendo sido observadas com morfologia lisa. Isto ocorre em função destas bactérias não apresentarem o lipopolissacarídeo de parede celular completo. (DIAZ, *et al.*, 1968) Outra característica peculiar da *B. canis* é que pode apresentar colônias de aspecto mucóide (CARMICHAEL; KENNEY, 1970). O gênero *Brucella* é classificado como categoria B pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e é agente importante como arma biológica, especialmente as espécies lisas. Podem permanecer viáveis na água e no solo úmido por mais de 10 semanas, sendo inativadas por agentes desinfetantes comuns ou calor. Apesar da sua importância, não há protocolo de vigilância e manejo clínico de brucelose humana para a espécie *B. canis*.

3 HOSPEDEIRO

3.1 Homem

No mundo, a maioria dos casos registrados da doença no homem são relatos individuais ou em pequenos grupos familiares. Em geral são casos de infecção causada por contato próximo a cães infectados e de profissionais laboratoristas envolvidos no diagnóstico dessa enfermidade (WALLACH, *et al.*, 2004; LUCERO, *et al.*, 2010). Grande parte dos estudos são estimativas pontuais que apresentam dados questionáveis.

Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência sorológica foi baixa, considerando uma população humana saudável, analisadas pelo teste de aglutinação em tubo, utilizando antígeno rugoso. Em outro estudo, baseado no teste de microaglutinação em placa detectou alta prevalência de reagentes sorológicos em pacientes que apresentaram febre de origem desconhecida, deixando dúvidas quanto à especificidade do teste (MONROE, *et al.*, 1975)

O homem é hospedeiro acidental da *B. canis* e o período de incubação da doença não é conhecido. O CDC, desde 1973, acumulou dados de isolamento de *B. canis* de aproximadamente 50 pessoas. Um recente artigo documentou 43 casos da infecção no homem, nos EUA, e outros 14 casos em outros países, desde 1967 (TRAXLER, Rita CDC, comunicação pessoal, 2012). Esses dados podem não ser considerados problema para a saúde pública, porém, deve-se dar importância ao fato de que é uma doença subdiagnosticada e que pode causar sérias consequências ao homem.

A infecção por *Brucella canis* ocorre, sobretudo, através do contato com cães infectados e suas secreções bem como pela exposição ao risco biológico em laboratórios de diagnóstico (LUCERO, *et al.*, 2005).

Não há sinais claros da infecção, entretanto podem ocorrer sinais inespecíficos como febre recorrente, dores musculares e articulares, os quais podem estar presentes em diversas outras infecções, dificultando o seu diagnóstico. Nesses casos, deve-se questionar o paciente quanto ao contato próximo com cães, especialmente o contato com cadelas que apresentaram histórico de aborto. Além disso, é importante considerar essa zoonose nos casos de doenças humanas com alteração do sistema imune. Pacientes imunocomprometidos com contato direto com cães infectados tornam-se os casos de maior risco de infecção, como descrito em um relato de caso de *B. canis* infectando pacientes HIV positivos, nos Estados Unidos (LAWACZECK, *et al.*, 2011).

Há pouca informação sobre o progresso clínico da brucelose canina em pessoas acometidas por outras doenças. A infecção parece ser exacerbada quando outros órgãos estão comprometidos. Recentemente, foram relatados três casos de infecção por *B. canis* em pessoas acometidas pela doença de Gaucher, síndrome de Guillian Barré, endocardite e laboratoristas envolvidos no diagnóstico da doença (MARZETTI, *et al.*, 2013), corroborando com os estudos anteriores acerca das dificuldades de se ter um diagnóstico, devido ao enorme espectro de sinais inespecíficos.

No Brasil, em 2012, foram detectados 4,6 % de reagentes positivos ao teste de ELISA indireto, para anticorpos contra a *Brucella canis*, em uma população de baixa renda, em Salvador. Nesse trabalho também foi detectada a presença de anticorpos contra brucelas lisas, através do teste de ELISA competitivo, detectando uma prevalência de 13% das amostras testadas. Dois indivíduos foram reagentes positivos para ambos os testes.

Em outro relato foi descrito a infecção causada pela *B. canis* entre um cão infectado e um menino que foi provavelmente infectado pela prática de zoorastia. A prova de IDGA detectou anticorpos contra *B. canis* no menino e no cão. Entretanto não foi possível o isolamento do agente dos reagentes (ROXO, *et al.*, 1990).

Na Argentina foram detectadas pessoas reagentes positivos, confirmados pelo teste imunoenzimático indireto (LUCERO, *et al.*, 2005). Neste país, houve relato de infecção humana pela variante não mucóide da *B. canis*, que é utilizada no diagnóstico sorológico em função da maior especificidade do teste. Esta variante, apesar de ser considerada de baixa virulência no cão, é tão patogênica no homem quanto à infecção por *B. canis* mucóide (WALLACH, *et al.*, 2005). Neste mesmo país, há relato de sinais clínicos da infecção por *B. canis* com isolamento do agente, envolvendo três famílias, uma cadela e seus três filhotes (LUCERO, *et al.*, 2010). Os mesmos autores, em 2005, detectaram um caso de um menino com sinais clínicos de brucelose, não reagente à *B. abortus* e com hemocultivo positivo para *B. canis*, mostrando a importância de se incluir a brucelose por *B. canis*, além da *B. abortus*, nas suspeitas da rotina clínica.

A endocardite é uma das complicações mais sérias da brucelose e que pode ocorrer num percentual compreendido entre 1 a 11% dos casos relatados. Dos 186 pacientes diagnosticados com endocardite, 13 foram causados pela *Brucella* spp (REGUERA, *et al.*, 2003). As brucelas diferentes das endocardites causadas por outras bactérias têm a tendência de produzir fibrose, hialinização e calcificação e a mortalidade está relacionada, na maioria

das vezes, por falha cardíaca, onde 82% dos casos há envolvimento da valva aórtica e, com menos frequência, envolvendo valva mitral (KÖSE, *et al.*, 2012).

O Ministério da Saúde dos Estados Unidos reconhece a brucelose como doença ocupacional, com notificação obrigatória (KASMIERCZAC, National Association of State Public Health Veterinarians, 2012)

Em 2001, foi implantado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil, focando somente às infecções pela *B. abortus*.

Todos os casos de brucelose são reportados ao CDC, porém não há discriminação dentre as espécies do gênero e por este motivo não se sabe o percentual dentre os casos registrados são causados pela *B. canis*.

A variabilidade genética e geográfica entre as linhagens de *B. canis* pode estar associadas a diferentes graus de patogenicidade. Recentemente, em um artigo publicado evidencia a presença de componentes celulares específicos de isolados de *Brucella canis* em diferentes continentes. Observaram que as cepas da *B. canis* isoladas na Argentina, Colômbia e México continham ácidos graxos específicos, os quais anteriormente tinham sido encontrados em amostras de *Brucella* lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), as quais foram historicamente mais patogênicas que as espécies rugosas (BROWER, *et al.*, 2013). A presença destes componentes pode ser relacionada à patogenicidade das amostras assim como à localização geográfica, ou seja, há associação com as maiores prevalências e a maior gravidade da enfermidade. Estes dados podem contribuir para a melhor compreensão do comportamento biológico do agente e assim uma melhor atuação no controle e prevenção da infecção brucélica aos diferentes hospedeiros.

3.2 Cão

Os cães podem infectar-se por diversas espécies do gênero *Brucella*, como *B. canis*, *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, entre outras. A infecção canina, na maioria dos casos, é ocasionada pela *B. canis* e a forma transmissão principal é por via venérea. No Brasil, entretanto há casos em que a *B. abortus* está envolvida na infecção de cães criados em regiões rurais onde há ocorrência de brucelose bovina. O cão doméstico é o principal reservatório, mas pode acometer canídeos silvestres e raramente gatos (CARMICHAEL; JOUBERT, 1988; WANKE, 2004).

A infecção pode ocorrer pelo contato com cães infectados; pela ingestão ou através de aerossóis de tecidos placentários; de fetos abortados; de neonatos e descargas vaginais. Entretanto, urina, sangue, leite, saliva e fezes também podem conter o agente etiológico (WANKE, 2004). Também há possibilidade de transmissão vertical (congênita), aerossóis e através de fômites. A realização de transfusões sanguíneas com a utilização de animais doadores infectados constitui uma forma rara, mas importante na transmissão da doença, devendo somente ser realizadas com animais sorologicamente negativos, pois a bacteremia na infecção por *B. canis* pode persistir por mais de cinco anos (CARMICHAEL, 1990).

A gravidade da brucelose pela *B. canis* é clinicamente variável, indo desde o estado de aparente normalidade até o fraco desempenho reprodutivo traduzido por graves sinais clínicos nos reprodutores caninos ou ainda na apresentação de sinais inespecíficos (CARMICHAEL; JOUBERT, 1987).

Cães infectados podem transmitir o agente para outros suscetíveis mesmo depois de cessada a bacteremia e sem apresentar sinais clínicos da doença. (CARMICHAEL; SHIN, 1996; LUCERO, *et al.*, 2005).

Os sinais clínicos não são patognomônicos, podendo estar presentes em uma grande variedade de doenças. Os animais podem apresentar prolongada bacteremia sem febre, iniciando de duas a três semanas após a infecção, e podendo durar anos. O período de incubação é variável.

A manifestação clínica mais frequente nas fêmeas inclui o aborto e a infertilidade nas fêmeas e epididimite (Figura 1) e atrofia testicular nos machos. Outros sinais clínicos secundários e não reprodutivos podem ocorrer tais como linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite, uveíte, discoespondilite (MEGID, 2002), glomerulonefrite, osteomielite, (DÓREA, *et al.*, 2000) e abscessos (BERTHELOT; BASTUJ, 1996).

Nas fêmeas, o sinal clássico é o aborto no terço final da gestação, entre 30-57 dias, sendo mais comum no intervalo de 45-55 dias em 75% dos casos. O aborto geralmente é acompanhado de secreção vaginal que persiste por semanas. (SHIN; CARMICHAEL, 1999; HOLLET, 2006) A fêmea infectada pode apresentar abortos consecutivos, natimortos ou ocorre o nascimento de filhotes prematuros e fracos. Eles podem ser infectados no útero, durante ou após o parto.

Os filhotes infectados que nascem aparentemente normais podem apresentar bacteremia por vários meses e, dessa forma, transmitir o agente. Pode ocorrer reabsorção embrionária ou morte do embrião entre a segunda e terceira semana de gestação, caracterizando infertilidade nas fêmeas. Estes sinais são observados em canis infectados, provavelmente pela densidade de animais e à rápida disseminação do agente.

Nos machos, os sinais clínicos mais evidentes são epididimite e prostatite. A orquite é menos frequente na infecção por *B. canis*, mas eventualmente ela pode ocorrer e, com o progresso da doença, pode ocorrer atrofia testicular e posteriormente esterilidade.

Lesões oculares foram relatadas de casos de doença natural ou estudos experimentais causados por *Brucella canis*, apresentando uveíte, corioretinite, panuveíte, endoftalmite, panoftalmite, deslocamento de retina, vitrite e ceratoconjuntivite.

Foi descrito caso de cães com endoftalmite causada pela *B. canis*, infecção confirmada por hemocultura. (LEDBETTER, *et al.*, 2009). As lesões incluíam uveíte anterior de leve a discreta hiperpigmentação da íris, forte infiltração vitreal e corioretinite multifocal. O diagnóstico de brucelose foi confirmado pelo isolamento da *Brucella canis* no hemocultivo em dois animais e noutro, através do teste de PCR do humor aquoso e sangue.

Figura 1 - Foto aproximada de um cão com epididimite por consequência da infecção por *B. canis*.



3.3 Outros

Em São Paulo, um inquérito sorológico focando felinos domésticos detectou anticorpos contra a *B. canis* utilizando a técnica de SALT. O teste estimou os reagentes em

3% das amostras analisadas. Entretanto a tentativa de isolamento pelo hemocultivo foi negativa (LARSSON, *et al.*, 1984).

Recentemente foi detectado por isolamento e pela técnica de PCR um caso de bovino infectado por *B. canis*. Nesse caso havia histórico de aborto no rebanho analisado e também foi detectada a presença da *Brucella abortus*. (BAEK, *et al.*, 2012) Apesar de o bovino ser considerado resistente à infecção pela *B. canis*, não se sabe de que forma a relação agente-hospedeiro pode evoluir, podendo de alguma forma ser transmitida e causar doença.

4 PATOGENIA

As brucelas lisas ou rugosas tradicionalmente infectam seus hospedeiros preferenciais ou acidentais, através das mucosas, incluindo as do trato digestivo, genital, respiratório e conjuntival. A via de transmissão depende da espécie é venérea, incluindo a *B. canis* e *B. ovis*, porém nos ruminantes, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. Em seguida, são fagocitadas principalmente pelos macrófagos e carregadas até os linfonodos, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses. Após a infecção, as células do sistema mononuclear fagocitário, sobretudo macrófagos, ligam-se à bactéria por meio de receptores específicos ou com a ajuda dos anticorpos opsonizantes. O agente infeccioso é interiorizado, digerido e suas frações antigênicas são expostas na superfície da membrana celular. Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a serem produzidos, cerca do quinto ao sétimo dia pós-infecção, alcançando níveis máximos por volta do décimo terceiro ao vigésimo primeiro dia. Seguidos pelos anticorpos IgG, detectáveis um dia após a IgM, atingindo a máxima soro-concentração entre 28 e 42 dia. Nos animais infectados pelo gênero *Brucella* os níveis de IgM diminuem rapidamente, porém os níveis de IgG persistem, sobretudo a IgG1, principal subclasse de anticorpo presente no soro sanguíneo de animais infectados. Após a multiplicação inicial, ganham a corrente sanguínea por meio do ducto torácico, dentro dos macrófagos ou livres no plasma. Vários períodos de bacteremia podem ocorrer. Difundem-se nesta fase para os tecidos do hospedeiro, colonizando principalmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, quais sejam, baço, fígado e linfonodos (principalmente os supramamários), onde podem acarretar alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos levando à esplenomegalia, hepatomegalia e, às vezes, hiperplasia linfoide (BISHOP, *et al.*, 1994).

A *B. canis* infecta preferencialmente os testículos, próstata, útero e vagina dos cães. A capacidade de infectar próstata explica o fato de se isolar maior quantidade da bactéria na urina dos machos. Pode ocorrer alteração dermatológica escrotal em decorrência das lambeduras frequentes causadas pela dor da epididimite, e pode haver contaminação por *Staphylococcus aureus*. (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Estudos experimentais evidenciaram alterações espermáticas detectadas no ejaculado por volta da quarta semana pós-infecção e consistindo principalmente de peça intermediária edemaciada e presença de gotas citoplasmáticas distais. Cauda enrolada e refração acrossomal podem ocorrer com menor frequência. Em cães infectados por mais de cinco semanas,

percebeu-se um decréscimo do volume seminal e ejaculação dolorosa, mas a libido não foi alterada. Com oito semanas de infecção, as anormalidades espermáticas tornam-se mais severas, incluindo cauda fortemente enrolada, cabeça destacada, peça intermediária dobrada e acrossomas deformados. Nesta fase, a motilidade espermática é fortemente reduzida, chegando a apenas 10% de espermatozóides móveis. Aglutinações espermáticas estão presentes a partir de 12 semanas de infecção e ocorrem porque os animais desenvolvem uma resposta autoimune contra os espermatozóides. Essas lesões causadas pela *B. canis* no sistema reprodutivo dos machos conduzem a um prognóstico desfavorável. (GEORGE, *et al.*, 1979) No Chile, em 2002, a análise de achados histológicos de cães reagentes à *B. canis* revelou um desenvolvimento espermático alterado e a presença de eritrócitos no interior dos túbulos seminíferos, causando portanto infertilidade. (BORIE, *et al.*, 2002)

A *B. canis* pode se instalar em outros tecidos, causando discoespondilite, uveíte, glomerulonefrite, meningite, endocardite. Os animais infectados pela via oral apresentam os linfonodos retrofaríngeos aumentados de volume, enquanto as fêmeas infectadas pela via vaginal normalmente apresentam aumento de volume nos linfonodos inguinais superficiais e ilíacos externos. Este aumento de volume é palpável já na segunda semana após a infecção. Com a progressão da doença outros linfonodos podem ser acometidos, tornando-se também evidente a esplenomegalia. Outra alteração comum é a presença de infiltrado inflamatório em todos os órgãos do trato geniturinário. (CARMICHAEL, 1990)

Entretanto, muitos cães podem apresentar-se assintomáticos, podendo estar eliminando o agente através de secreções e pela copulação, constituindo fonte de infecção para outros animais e contribuindo para a disseminação da infecção na população animal e no homem. (KEID, *et al.*, 2004, WANKE, 2004). Enquanto cães recuperados apresentam resultado negativo ou baixos títulos de anticorpos aglutinantes e são imunes à reinfeção, o que reforça o papel da imunidade mediada por células na proteção contra a infecção por *B. canis*. (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990)

5 DIAGNÓSTICO

5.1 Clínico

Os sinais clínicos são, normalmente, insuficientes para se estabelecer o diagnóstico de brucelose canina, pois as manifestações clínicas podem ser bastante variáveis, infrequentes e inespecíficos. A suspeita clínica pode ser baseada no histórico de aborto e falhas na reprodução de um canil ou da população em que o animal está inserido, uma vez que o contato com as secreções de aborto (feto, líquidos fetais e membranas, além de secreções vaginais) são considerados importantes para a transmissão da enfermidade.

As fêmeas podem apresentar sinal de infertilidade, secreção vaginal, aborto, número reduzido de filhotes nascidos, mal-formação fetal, pseudociese, piometra. Os machos podem apresentar epididimite e orquite, perda de libido.

Em um estudo publicado em 2008, foram detectados reagentes em 6,5% de cães, que apresentaram histórico de sinais clínicos reprodutivos, enquanto que, no grupo dos animais assintomáticos, verificou-se 3,4% de animais reagentes. Estatisticamente, a correlação entre a presença de sinais clínicos e animais reagentes foi positiva para os machos. Quando o número da amostragem foi duplicado em uma simulação, concluiu-se que os animais que apresentavam sinais clínicos tinham taxa de reagentes quatro vezes maiores nos testes sorológicos, em relação aos animais clinicamente sadios, confirmando a associação de histórico de infertilidade e distúrbios reprodutivos com a presença de anticorpos anti-*Brucella canis*, nos machos (PORTO, *et al.*, 2008). Keid, em sua tese de 2006, também encontrou resultados reagentes pelos métodos de SAR, SAR-2ME, IDGA, hemocultura, PCR em sangue e cultivo de swab vaginal com maior proporção em cães que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a infecção. Sinais como linfadenite, dermatite escrotal, atrofia testicular, metrite, e sinais mais raros como doenças articulares, discopatias, uveíte e meningite, podem ocorrer. Os jovens podem ter atraso no desenvolvimento, apresentar-se fracos e também podem não apresentar sinal clínico.

Os valores sanguíneos, incluindo bioquímicos e urinários geralmente não apresentam alterações, apesar do caráter sistêmico da infecção e assim impossibilitando a utilização desses dados em uma suspeita clínica (MEGID, *et al.*, 2000). No exame ultrassonográfico, os animais podem apresentar hepatomegalia e esplenomegalia. A partir do histórico e sinais clínicos, deve-se coletar material de investigação e submetê-los a exames laboratoriais.

5.2 Bacteriológico

As amostras para exame bacteriológico devem ser colhidas de forma mais asséptica; acondicionadas em meio de transporte específico e encaminhadas em poucas horas ao laboratório. Se o tempo entre a coleta e o processamento for elevado, é interessante que as amostras sejam congeladas a -20°C até seu processamento laboratorial. Desta forma, é importante que a temperatura de armazenamento seja mantida durante o tempo de transporte do material, sob a pena de perda de viabilidade da *B. canis* (CARMICHAEL, 1998).

O emprego dos procedimentos de segurança biológica é fundamental no manuseio e na coleta de amostra suspeita de infectada pela *B. canis*, pois a brucelose canina é uma zoonose de transmissão por aerossóis, ingestão e contato com mucosas ou soluções de continuidade. Desta forma, é importante o emprego de material de proteção individual, como luvas, óculos, máscara, gorro e aventais, evitando uma doença laboratorial (MINHARRO, *et al.*, 2005).

O hemocultivo (sangue total) é o material de eleição, na ausência de fetos abortados e de secreções vaginais, visto que a bacteremia permanece por longos períodos. Os microrganismos são encontrados na fração leucocitária. Mais de 50% dos cães infectados apresentam uma bacteremia que dura um ou mais anos. A bacteremia pode ser detectada 2 a 4 semanas após a infecção e, em não havendo tratamento do animal, ela pode persistir por mais de cinco anos. O microrganismo pode ser isolado de diversos tecidos e secreções, como sangue, linfonodos, baço, fígado, medula óssea, próstata, urina, sêmen, fetos abortados e secreções vaginais durante o estro, no pós-aborto e pós-parto. A hemocultura, entretanto, não deve ser o único critério para diagnosticar a infecção, já que a bacteremia pode não estar presente na fase crônica da doença e requer um tempo mínimo de dez dias para a obtenção de resultados. Isso ocorre porque a bacteremia passa a ser intermitente e eventualmente diminui com a infecção crônica. Aos 58 meses de infecção, menos de 25% dos animais infectados apresentam hemocultura positiva. A hemocultura negativa, porém, não exclui a hipótese de infecção por *B. canis*, especialmente nos casos de infecção crônica, contudo a hemocultura positiva confirma o diagnóstico. Devido à localização intracelular em células do sistema mononuclear fagocitário, a bactéria pode ser recuperada a partir de aspirados de medula óssea, na ausência de hemocultura positiva (JOHNSON; WALKER, 1992).

O isolamento e a identificação de *B. canis* é um método de alta especificidade diagnóstica, pois demonstra o agente etiológico da doença, mas sua sensibilidade é baixa em função de

vários parâmetros, incluindo eliminação intermitente, amostras mal colhida e mal conservada e o uso de antimicrobianos.

O isolamento de *B. canis* tem que ser realizado em laboratórios que possuam instalações adequadas para esta finalidade em função de sua classificação como patógeno de biossegurança 3 (TEIXEIRA; VALLE, 1996).

5.2.1 Amostras de placenta, tecidos fetais

Nas fêmeas, o isolamento dá-se a partir de fêmeas gestantes ou na fase estral, de material colhido de útero e placenta, além dos fluidos vaginais e uterinos (CARMICHAEL, 1990). É interessante colher amostra de líquidos e membranas fetais, fetos mortos assim como nos casos de aborto, nascimentos de ninhadas pequenas, filhotes fracos e natimortos. A inoculação do material vaginal, colhido no período imediatamente após o aborto ou parto é de importância diagnóstica. A *Brucella canis* pode ser isolada por várias semanas depois do aborto ou do parto.

Nos animais impúberes a *B. canis* não é frequentemente isolada de secreções vaginais, em função da seletividade do agente pela maturidade sexual (JOHNSON; WALKER, 1992).

5.2.2 Amostras de sêmen

Nos machos, o cultivo de sêmen normalmente produz um grande número de unidades formadoras de colônias (UFC), após um período de 3 a 11 semanas pós-infecção. Entretanto, o isolamento a partir desse material pode ser dificultado, pois a eliminação de *B. canis* pode ser intermitente e em baixas concentrações no sêmen, o diagnóstico bacteriológico passa a ser geralmente negativo nestas amostras (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998).

5.2.3 Amostras de urina

O cultivo bacteriológico positivo da amostra de urina pode ser obtido de 8 a 30 semanas após a infecção. A concentração urinária da *B. canis* varia desde 10 UFC/mL a 105 UFC/mL de urina (CARMICHAEL; GREENE, 1990). Este material pode ser utilizado em alguns animais, principalmente machos, quando a hemocultura é negativa. Entretanto é necessário se fazer a coleta da urina por cistocentese, evitando o crescimento exagerado de contaminantes.

5.2.4 Outras

As brucelas podem ser isoladas a partir de aspirados de medula óssea na ausência de hemocultura positiva, especialmente pela localização intracelular em células do sistema mononuclear fagocitário (JOHNSON; WALKER, 1992).

Em 2011, um estudo na Parnaíba, estimaram os reagentes em 3,11 % de para *B. canis*, pela técnica de IDGA e em um animal foi isolado o organismo a partir de medula óssea, confirmado pela PCR (FERNANDES, *et al.*, 2011).

Em 2006, pesquisadores obtiveram 100% de concordância dos cultivos de aspirado de medula óssea com a hemocultura em cães já infectados, demonstrando que apesar da dificuldade de coleta, essa amostra é confiável para o diagnóstico (SALGADO, *et al.*, 2006).

O isolamento, nos casos de uveíte por *B. canis* pode ser feito diretamente a partir de amostras do humor aquoso (JOHNSON; WALKER, 1992). A bactéria também já foi isolada de lesões como discospondilite e osteomielite. O agente foi isolado no aspirado de testículo em um cão sorologicamente positivo para *B. canis* e que apresentava aumento de volume nesse órgão (MEGID, *et al.*, 2002). Nesse trabalho, as amostras de urina, líquido prostático e sangue foram negativos para o cultivo microbiológico. Foi descrito o isolamento de *B. canis* de um cão reagente ao IDGA, que apresentava orquite, epididimite e atrofia testicular, demonstrando que é interessante a coleta de tecidos de órgãos afetados, mesmo quando a hemocultura é negativa (GOMES, *et al.*, 1999).

5.3 Sorológico

Os testes sorológicos utilizados na rotina diagnóstica devem ser capazes de diferenciar a resposta de anticorpos à infecção pela *B. canis* da resposta humoral aos outros agentes infecciosos, visto que os sinais clínicos da brucelose não são patognomônicos, que podem ocorrer no mesmo local geográfico e que possuam apresentação ou características de infecção semelhantes. Esta propriedade da técnica sorológica está fortemente ligada à qualidade do antígeno usado no teste se antígenos de membrana ou de componentes citosólicos.

Na triagem é necessário que os testes sejam bem sensíveis, pois podem detectar todos os positivos na população suspeita, sendo viáveis, rápidos e de fácil execução. Muitos métodos sorológicos têm sido empregados no diagnóstico da brucelose canina, mas, devido especialmente à presença de anticorpos inespecíficos, pois individualmente nenhum deles é considerado como teste definitivo (CARMICHAEL, 1976). O uso de pelo menos dois testes

sorológicos de triagem é priorizado, já que cada teste identifica momentos diferentes da infecção e maior confiabilidade dos resultados. A maioria dos testes sorológicos não apresenta resultados consistentes, durante as quatro semanas iniciais da infecção. O elevado número de falso-positivos neste teste é necessário um teste confirmatório que tenha maior especificidade. Nenhum animal positivo no teste de triagem pode ser considerado infectado antes de ser testado positivo em teste confirmatório ou ser isolado o agente em cultura bacteriológica.

Os antígenos usados no diagnóstico laboratorial das infecções por *Brucella* consistem de várias proteínas somáticas e componentes de superfície da bactéria, mas ocorrem similaridades antigênicas entre bactérias do mesmo gênero, como *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* e *B. abortus* (MYERS, *et al.*, 1972; BALDI, *et al.*, 1994, 1997; EBANI, *et al.*, 2003). Há descrição de epítomos comuns entre as espécies de *Brucella* e bactérias ambientais dos gêneros *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* e *Ochrobactrum* (DELPINO, *et al.*, 2004). Reações cruzadas resultando falso-positivos entre *Brucella* e outras bactérias patogênicas incluem *Salmonella* (NIELSEN, *et al.*, 2007), *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* (MATEU-DE-ANTONIO, *et al.*, 1993; BOUNAADJA, *et al.*, 2009).

A soro-conversão foi detectada em animais infectados experimentalmente e acompanhados por 13 semanas, demonstrando a bacteremia intermitente (LARSSON, *et al.*, 1984). Neste caso, ocorre o desaparecimento ou diminuição dos títulos sorológicos, porém com persistência do agente nos tecidos infectados (MEGID, *et al.*, 2000) e por este motivo, deve-se aliar o exame bacteriológico aos testes sorológicos.

5.3.1 Soro-aglutinação rápida em lâmina (SAR)

A SAR é o teste sorológico mais comumente utilizado na triagem das infecções por *B. canis*. É um teste barato, rápido e de fácil execução, podendo ser realizado em qualquer clínica veterinária (CARMICHAEL; SHIN, 1996). Na SAR é utilizado um antígeno elaborado com a *B. ovis*, corado com rosa de bengala. Apresenta muitas vantagens sobre os outros testes, incluindo a precocidade no diagnóstico, pois já revela anticorpos a partir de três a quatro semanas da infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1998). Além disso, o teste de soro-aglutinação rápida em lâmina permite a utilização de amostras de sangue hemolisadas, fator que limita o teste de soro-aglutinação em tubo. (RADAKHSH; CARMICHAEL e DOUGLASS, 1982)

Os resultados positivos devem ser interpretados com cautela, pois uma proporção significativa de resultados falso-positivos pode ocorrer. Esse teste apresenta boa sensibilidade, mas a especificidade é baixa, ou seja, o resultado negativo é uma forte evidência de que o animal não está infectado, mas apenas 50% dos animais cujos soros apresentam aglutinação são realmente positivos. Assim, animais reagentes ao SAR não podem ser considerados infectados antes de serem submetidos a teste confirmatório (MINHARRO, *et al.*, 2005). Keid, em 2006, estimou a sensibilidade de 81,25% nesse teste, enquanto que o IDGA foi de 75%; o PCR em sangue foi de 89,6% e a PCR em suábio vaginal foi de 54%. O teste de SAR apesar de menos sensível do que a PCR constitui um teste de alta sensibilidade, mais barato e mais acessível para rotina diagnóstica.

Alguns testes para diminuir o número de reações falso-positivas incluem o tratamento prévio dos soros com 2-mercaptoetanol (2ME) que elimina a interferência de IgM não-específica, aumentando a especificidade sem alterar a sensibilidade do teste. As moléculas de IgM por serem decavalentes possuem uma maior avidéz que as moléculas de IgG, que são bivalentes. O 2ME desnatura a IgM pela destruição das pontes dissulfídricas, minimizando, assim, as ligações inespecíficas (JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; SHIN, 1996). Estes testes apesar de mais específicos não devem ser considerados como testes confirmatórios (JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998).

Outra tentativa objetivando a diminuição das reações falsos-positivas é a utilização de uma amostra não mucóide de *B. canis* (M-) na preparação do antígeno, associada ao tratamento prévio dos soros com 2ME. Isso levou à diminuição de resultados falso-positivos para menos de 10% sem perda da sensibilidade da SAR – 2ME (DAMP, *et al.*, 1973).

Um estudo, em 2002, analisou sorologicamente um cão com orquite em que foi isolada *B. canis* de aspirado testicular e verificou que a prova de RSAT positiva sem 2ME e negativa com 2ME podem indicar infecção recente (MEGID, *et al.*, 2002).

5.3.2 Soro-aglutinação lenta em tubo (SAL)

O teste de SAL, por sua vez, fornece os resultados em título (considerado teste semiquantitativo) e, muitas vezes, utilizada para a confirmação da SAR-2ME (CARMICHAEL, 1998). Esse teste é menos sensível e um pouco mais específico que a SAR. Assim, pode-se indicar como método para quantificar e monitorar a resposta sorológica de cães infectados e tratados (JOHNSON; WALKER, 1992, CARMICHAEL; GREENE, 1990).

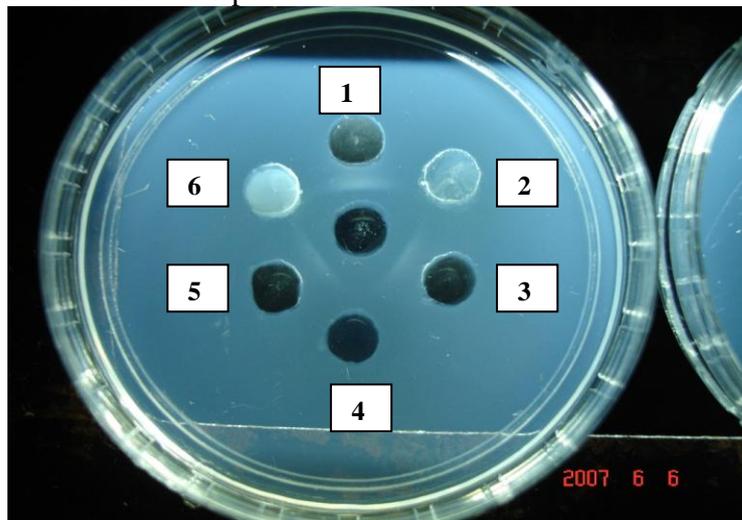
Estudos realizados nos EUA sugerem que um título de 1:100 no SAL-2ME (soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol) é indicativo da infecção por *B. canis* (GEORGE; CARMICHAEL, 1984). Todavia, Carmichael e Greene (1998) sugeriram que títulos em até 1:50 devem ser considerado negativo ou em início de infecção (cerca de duas a três semanas); entre 1:50 e 1:100 são considerados suspeitos e devem ser retestados 30 dias após e quando forem iguais ou superiores a 200 são positivos.

Resultados falsos negativos nesses testes também foram reportados (KEID, *et al.*, 2009). Portanto, o isolamento pelo cultivo bacteriano provenientes dos tecidos biológicos é ainda necessário para confirmar o diagnóstico sorológicos laboratorial (CARMICHAEL; SHIN, 1996; BALDI, *et al.*, 1997; WANKE, 2004).

5.3.3 Imunodifusão em gel de Agar (IDGA)

O IDGA (Figura 2) é o teste oficial para a brucelose canina no Brasil (OLIVEIRA, *et al.*, 2011). Ele demonstra precipitinas no soro de cães cinco a dez semanas após infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1993). Este método é considerado mais específico que a prova de soroaglutinação rápida utilizando 2ME, porém, ainda está sujeito a resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com agentes como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. (JOHNSON; WALKER, 1992)

Figura 2 - Foto de um teste de IDGA. Os poços 3 e 5 são referentes à soros de cães reagentes positivos à *Brucella canis* e o poço 1 é onde foi colocado o controle positivo do teste.

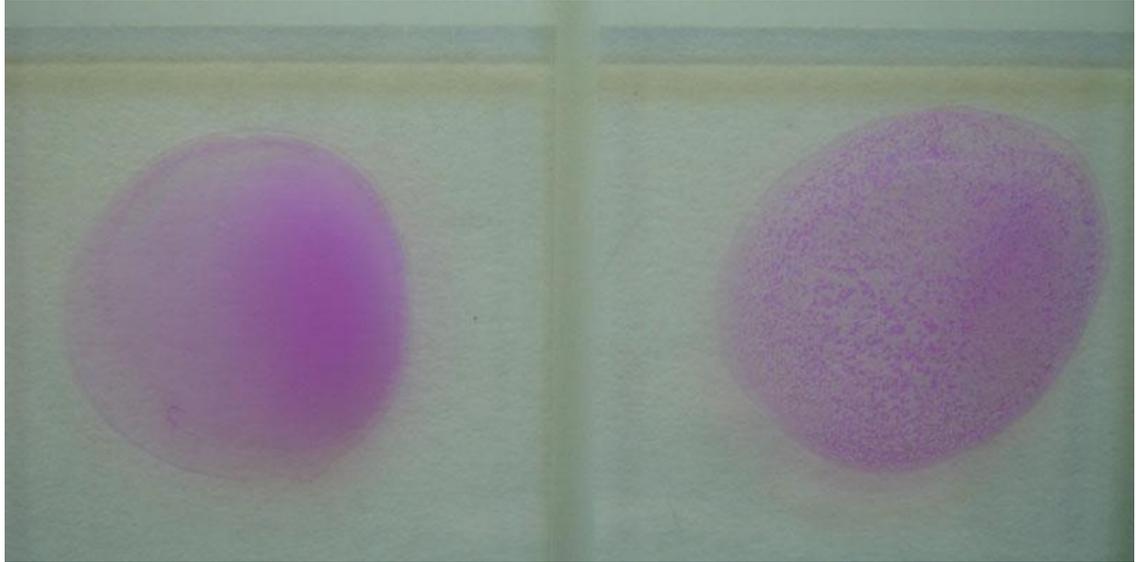


Há dois antígenos que podem ser utilizados no IDGA: antígenos de parede celular (LPS) que pode ser obtido das linhagens de *B. canis* ou *B. ovis* e antígenos de proteínas citoplasmáticas (PC) obtidas das espécies do gênero *Brucella* (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998; MINHARRO, *et al.*, 2005). O IDGA-LPS não é tão facilmente utilizável quanto a SAR ou a SAL, porém, a preparação do antígeno e a leitura dos resultados são mais complexas. Embora seja mais específico do que a SAR – 2ME, reações cruzadas com outros microrganismos ainda podem ocorrer. Além desse fato, a interpretação do resultado é subjetiva, por não ser um método quantitativo.

O teste de imunodifusão, utilizando antígeno citoplasmático é o método mais específico na detecção das brucelas rugosas. Utiliza extrato proteico do citoplasma bacteriano da *B. canis* não mucóide (M-) e apresenta menor proporção de reações cruzadas. Uma grande vantagem da IDGA utilizando antígenos citoplasmáticos é a possibilidade de diagnosticar animais cronicamente infectados, permitindo a detecção de anticorpos circulantes até 3 anos após a bacteremia ter cessado, enquanto que os outros testes apresentam resultados negativos nesses casos. Entretanto, nas infecções recentes, o diagnóstico pelo IDGA fica prejudicado, pois anticorpos circulantes são detectados somente a partir de 2 a 3 meses após a infecção, ou seja, um mês após a detecção pelo SAL – 2ME (JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998; CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Em função de os antígenos citoplasmáticos serem comuns a outras espécies de *Brucella*, o IDGA – PC apresenta reações positivas quando as infecções são causadas por *B. suis*, *B. abortus* e *B. ovis*. No entanto, infecções por outras espécies de *Brucella* raramente ocorrem em cães, exceto infecções por *B. abortus*, que podem acometer com maior frequência cães de áreas rurais onde pode ocorrer contato com bovinos infectados, ou mesmo animais adultos de procedência desconhecida. A infecção pela *B. abortus*, através do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (Figura 3) foi detectada em 18,4% dos atendidos no ambulatório de clínicas veterinária no município de Maceió (PORTO, *et al.*, 2008) Entretanto, no município de Monte Negro, Rondônia, não foram identificados reagentes ao AAT nas amostras de cães rurais e urbanos (AGUIAR, *et al.*, 2005).

Figura 3 - Teste de AAT para detecção de cães infectados por *Brucella abortus*. À esquerda da figura mostra um resultado negativo e à direita um resultado positivo.



O teste de IDGA utilizando antígeno produzido com *B. canis* em paralelo com o antígeno produzido com *B. ovis* aumenta a eficácia e a confiabilidade do diagnóstico sorológico da brucelose canina, podendo ser recomendado como teste auxiliar confirmatório para o diagnóstico da enfermidade (MARASSI, *et al.*, 2004). Além disso, quando O IDGA de *B. ovis* é usado como teste confirmatório após a inativação pelo teste de 2ME, o resultado é mais específico, pois há menor probabilidade de reações inespecíficas, devido à diminuição de IgM (MATEU-DE-ANTONIO, *et al.*, 1994).

Além disso, há outra possibilidade de se utilizar o antígeno rugoso obtido da linhagem RB51 como alternativa no diagnóstico laboratorial da brucelose canina e ovina (GOMES, *et al.*, 2007).

Em 1976, Wald e Fernandes estimaram a prevalência de anticorpos contra a *B. canis* em 11,97% dos cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV-UFRGS), em Porto Alegre. Em 2006, outros pesquisadores, utilizando o mesmo modelo epidemiológico obtiveram resultados similares àqueles obtidos 30 anos antes, concluindo que nada foi realizado para alterar a situação epidemiológica da brucelose em nosso meio (GOMES, *et al.*, comunicação pessoal, 2006).

Como mostrados na Tabela 1, há discrepâncias nos resultados destes testes sorológicos, que podem ser justificadas pela ocorrência de reações inespecíficas quando da utilização da IDGA, pois os antígenos da parede celular (LPS) de algumas bactérias Gram-negativas apresentam reação cruzada com a *Brucella canis* (JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; GREENE, 1993). Pode ocorrer também porque alguns animais sororreagentes ao IDGA poderiam estar na fase aguda da infecção, onde são produzidos anticorpos da classe IgM (CARMICHAEL; KENNEY, 1970). O emprego da técnica de IDGA-2ME desnaturaria as IgM, detectando apenas animais na fase crônica da infecção. Outra possibilidade seria a desnaturação das IgM procedentes das reações inespecíficas (GREENE; GEORGE, 1984; JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; SHIN, 1996), reduzindo também o número de animais reagentes quando se utiliza o 2-ME.

Tabela 1 – Dados de prevalências (%) de cães, aparentemente saudáveis, reagentes à *B. canis*, no Brasil, a partir do teste de IDGA com antígeno de *B. ovis*.

AUTOR/ ANO	PREVALÊNCIA (%)	TAMANHO DA AMOSTRA
Bezerra <i>et al</i> / 2012	3,4	638
Fernandes <i>et al</i> / 2012	0	98
Silva <i>et al</i> / 2012	4	100
Dorneles <i>et al</i> / 2011	44,53	374
Moraes <i>et al</i> / 2011	0	314
Vasconcelos <i>et al</i> / 2008	2,35	170
Cavalcanti <i>et al</i> / 2006	5,88	85
Almeida <i>et al</i> / 2004	14,2	635
Alves <i>et al</i> / 2003	3,6	274
Ferreira <i>et al</i> / 2003	58,3	----
Megid <i>et al</i> / 1999	4,6-57,1	25-41
Gomes <i>et al</i> / 2006	18,52	27
Wald & Fernandes/1976	11,97	192

A Tabela 2 mostra que nos trabalhos de 2005 e 2008 os animais foram testados com AAT, para detecção de anticorpos anti-*B. abortus* onde foram detectados 18,4% de reagentes, no primeiro, e zero no segundo, respectivamente. Além disso, no primeiro trabalho, foi analisada também a prevalência de anticorpos anti-*B. canis* pelos métodos SAL e SAL-2ME, onde se detectou 4% e 0,3%, respectivamente (AGUIAR, *et al.*, 2005). A pesquisa de 2002 também

analisou as amostras de soro ao teste de SAR e SAR-2ME, nos quais os reagentes foram estimados em 1,77 % e 0,84 %, respectivamente (MORAES, *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Dados de prevalências de cães sororreagentes aos testes de IDGA e IDGA 2ME, produzidos no Brasil:

DATA	AUTOR	TRIAGEM / IDGA	CONFIRMAÇÃO / IDGA-2ME
2001	KEID <i>et al</i>	44,80%	6,25%
2004	AZEVEDO <i>et al</i>	48,75%	18,75%
2003	AZEVEDO <i>et al</i>	9,50%	3,65%
2005	AGUIAR <i>et al</i>	3,60%	0
2008	PORTO <i>et al</i>	4,40%	75%
2002/09	MORAES <i>et al</i>	18,84%	0,84%

As variações encontradas podem ser explicadas provavelmente devido à utilização de métodos sorológicos diversos com diferentes sensibilidades e especificidades e ao tipo de amostra estudada, bem como pela presença de animais no início da infecção, onde os anticorpos podem ainda não ser detectados no IDGA (CARMICHAEL; GREENE, 1993).

5.3.4 Reação de Fixação de Complemento (CFT)

A reação de fixação de complemento tem sido utilizada para o diagnóstico confirmatório de infecções por *B. ovis* e *B. abortus* e apresenta sensibilidade e especificidade elevadas. No entanto, é pouco utilizada na rotina para o diagnóstico da infecção de cães por *Brucella canis*. (AZEVEDO, *et al.*, 2004)

Em 2003, pesquisadores analisaram resultados de animais reagentes nas provas de triagem do IDGA (9,50%) e compararam com os resultados encontrados nas provas confirmatórias de IDGA-2ME (3,65%), CFT (3,41%) e IDGA-2ME + CFT (2,20%) (AZEVEDO, *et al.*, 2004). O mesmo autor, em 2004, analisou amostras que reagiram em 48,75% ao teste de IDGA, 18,75% ao IDGA-2ME e 17,50% ao CFT. Os resultados sugerem que a prova de CFT é comparável ao IDGA-2ME, sendo considerado adequado como teste confirmatório.

5.3.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Vários testes imunoenzimáticos têm sido desenvolvidos, utilizando tanto antígenos de parede de *B. canis* (SERIKAWA; MURAGUCHI; 1979) como antígenos citoplasmáticos de *B. abortus*, que são comuns a diversas espécies de *Brucella* (BALDI, *et al.*, 1994). Estes últimos têm como vantagem não apresentarem reação cruzada com outras bactérias que não sejam desse gênero biológico. O ELISA indireto é altamente específico, mas menos sensível que a SAL para a triagem de cães infectados (CARMICHAEL; GREENE, 1998). Em termos de sensibilidade, o ELISA tem sido considerado superior aos testes sorológicos de aglutinação (WANKE, *et al.*, 2002). É mais sensível que os testes de aglutinação e AGID (JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE, *et al.*; 2002; WANKE, 2004). Testes de ELISA indiretos de melhor sensibilidade foram obtidos com antígenos extraídos por solução salina aquecida (HSS) de amostra não mucóide de *B. canis* (variante M-) (MATEU-DE ANTONIO, *et al.*, 1993). Testes de ELISA com antígenos purificados têm sido indicados como provas confirmatórias aos testes de triagem, em substituição às provas com 2ME ou gel difusão (LUCERO, *et al.*, 2002; EBANI, *et al.*, 2003).

Pesquisas baseadas nos testes de ELISA para sorodiagnóstico de brucelose têm sido propostas, entretanto cada uma delas com resultados variáveis, dependendo das propriedades antigênicas usadas na análise (JOHNSON; WALKER, 1992; MATEU-DE-ANTONIO, *et al.* 1993; BALDI, *et al.*, 1994, 1997). Recentemente, outros métodos têm sido propostos para detectar a infecção canina, incluindo imunocromatografia (KIM, *et al.*, 2007) e métodos de PCR (KEID, *et al.*, 2007). Além disso, os métodos de aglutinação (WATARAI, *et al.*, 2007) e de fixação de complemento foram aperfeiçoados, desenvolvendo antígenos mais eficientes, aumento os valores de confiança das ferramentas utilizadas pela medicina veterinária e saúde pública.

Recentemente, foi publicado um estudo na Índia que relacionou a soroprevalência da brucelose canina estimadas por diferentes técnicas sorológicas com as preparações dos antígenos de *B. canis*, caracterizados por análise imunoquímica. Concluíram que o antígeno sonificado era mais adequado para uso no ensaio imunoenzimático (ELISA indireto), caracterizando um teste de alta sensibilidade, enquanto que o antígeno termorresistente foi mais adequado ao teste de IDGA, que seria utilizado como teste confirmatório devido a sua alta especificidade (BARKHA, *et al.*, 2011).

Em 2011, foi publicado um artigo que objetivava a validação do ensaio imunoenzimático como método sorológico útil no diagnóstico da brucelose canina causada

pela *B. canis* (OLIVEIRA, *et al.*, 2011). Dois antígenos e duas formas de extração foram comparados pelo ELISA e Western blot (WB), quanto a possíveis reações cruzadas com antígenos de *Leptospira* spp, *Ehrlichia canis*, CDV, *Neospora caninum*, *Babesia canis* e *Leishmania chagasi*. Os resultados evidenciaram maior acurácia e confiabilidade no teste de ELISA com antígeno termorresistente (técnica descrita por Myers *et al.*, em 1972) em relação ao WB, no qual se observou inúmeras reações cruzadas. Neste trabalho a sensibilidade foi estimada em 91,18% e a especificidade foi de 100% e acurácia de 96,47%.

Em 2007, foram relatados resultados um pouco diferentes utilizando a técnica de ensaio imunoenzimático e WB. Esses pesquisadores obtiveram uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 91%, utilizando mesma técnica de extração do antígeno (BARROUIN-MELO, *et al.*, 2007).

Há registros de inúmeras bactérias envolvidas em reações cruzadas com *Brucella*, as quais contêm epítomos em comum, entre elas *Salmonella* (NIELSEN, *et al.*, 2007), *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* (MATEU-DE-ANTONIO, *et al.*, 1993; BOUNAADJA, *et al.*, 2009). Há diferentes técnicas para extração de antígenos de *B. canis*, resultando em diferente composição protéica ou de estrutura primária dos epítomos, alterando conseqüentemente o resultado das análises. Alguns autores acreditam que antígenos citosólicos resultam em maior sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos em relação aos antígenos de membrana da *B. canis* (CARMICHAEL; JOUBERT, 1987).

5.3.6 Outros

Outros testes sorológicos foram desenvolvidos e entre eles estão a contraímunoeletroforese e a imunofluorescência indireta, mas são complexos e ainda não empregados na rotina dos laboratórios de diagnóstico. Em 2012, comparou-se a imunocromatografia com os testes RSAT-2ME, IDGA e ELISA. Os resultados foram insatisfatórios quanto à sensibilidade e não aplicável como teste de triagem. Entretanto ele era bastante específico, mas mesmo assim menos específico que o IDGA (WANKE, *et al.*, 2012).

5.4 Molecular

5.4.1 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Em 2007, um artigo analisou amostras de sêmen e swab vaginal de cães naturalmente infectados para detecção de *B. canis* por PCR. Os resultados foram comparados aos

bacteriológicos e PCR de soro e obtiveram equivalência, demonstrando ser o PCR de sêmen e de swab vaginal como alternativa confiável de diagnóstico (KEID, *et al.*, 2007).

Na Turquia, Aras e Uçan, em 2010, examinaram amostras de aspirado de linfonodo para pesquisa do agente através da PCR, evidenciando similaridade com os testes bacteriológicos.

Na Argentina, em 2011, examinando através da PCR em amostra de leite de uma cadela lactante foi possível detectar sinal positivo do leite, sangue, hemocultivo e testes sorológicos (OLIVERA; GIRALDO; DI-LORENZO, 2011).

O PCR apresenta, de uma maneira geral, maior sensibilidade no diagnóstico da brucelose canina quando comparada ao isolamento em meio de cultivo. Apesar do maior custo para a realização deste teste em relação ao cultivo, ele é mais rápido no diagnóstico confirmatório, principalmente para a detecção de animais infectados introduzidos em um canil comercial (KEID, 2006).

6 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Não é recomendado um único antimicrobiano para o tratamento (FLORES-CASTRO; SEGURA, 1976). A combinação de tetraciclina e gentamicina tem sido utilizada com administração de 2 a 3 vezes ao dia durante um a dois meses (HOLLETT, 2006). No controle da infecção ocular, a melhor escolha tem sido uma combinação (gentamicina, ciprofloxacina, doxiciclina, rifampicina) ou (doxiciclina, enrofloxacina, rifampicina, estreptomicina) (LEDBETTER, *et al.*, 2009).

A miociclina, tetraciclina, diidroestreptomicina, sulfadiazina trimetoprima, gentamicina, doxiciclina, enrofloxacina e várias combinações foram utilizadas para tratar a *B. canis*, segundo Nelson e Couto (2010). Entretanto a maior parte dos cães tratados permaneceu infectada, pois a bactéria se manteve no tecido prostático mesmo após o tratamento com diferentes antimicrobianos. Os danos testiculares normalmente são irreversíveis e os cães são facilmente suscetíveis à reinfeção.

A eficácia da terapia antimicrobiana aliada à castração de cães infectados foi analisada, em 1998, em um trabalho em que os autores obtiveram 91,6% de cura em 12 cães naturalmente infectados e acompanhados sorologicamente dois meses após o término do tratamento antimicrobiano. Os mesmos autores, em 2002, utilizaram simultaneamente a rifampicina e a estreptomicina após orquiectomia bilateral em um cão com brucelose. Estes autores revelaram que este protocolo terapêutico associado à castração, vem sendo utilizada em casos específicos no serviço de enfermidades infecciosas. A terapia nesses casos tem sido criteriosamente indicada em cães de alto valor afetivo e/ou econômico, preferencialmente, na ausência de crianças no domicílio. Contudo, ressaltaram que a terapia em cães com brucelose deve ser rigorosamente avaliada pelo médico veterinário e indicada exclusivamente em condições específicas (MEGID, *et al.*, 1998; 2002).

Geralmente os cães dos canis reagentes nos testes de triagem, deverão ser isolados e submetidos a testes mais específicos e, se confirmados deverão ser eliminados do canil. Uma abordagem diferente pode ser considerada para um animal de companhia, onde poderíamos empregar a terapia antimicrobiana associada à castração, reduzindo ou impedindo a eliminação de secreções genitais e a transmissão venérea. No entanto, o tratamento e a castração não excluem a possibilidade de que o animal possa permanecer fonte de infecção para outros animais ou membros da família (NELSON; COUTO, 2010).

Na Argentina, em 2012, em um estudo sobre brucelose canina dentro de um canil foi informado aos seus proprietários da importância de se monitorar e tratar cães infectados, uma vez que as análises de regiões de polimorfismos repetidos do DNA (VNTR) mostraram que as bactérias isoladas dos cães e do homem eram semelhantes, corroborando com a ideia da transmissão do cão para homem (REYNES, *et al.*, 2012) Além disso, dois cães mantiveram a bacteremia mesmo após o tratamento com antibacterianos e de um deles ainda se pode isolar o agente da urina. Esse estudo demonstrou que a infecção pode ser disseminada mesmo após a terapia antimicrobiana.

Apesar da sensibilidade *in vitro* da *B. canis* à alguns antimicrobianos, sabe-se que a terapia com antimicrobianos pode falhar e o cão pode continuar eliminando o agente para o ambiente e continuar sendo fonte de infecção para outros animais e o homem.

Alguns critérios sanitários para a aquisição de animais em um canil são necessários serem adotados como medida preventiva:

- Adquirir preferencialmente cães de canis livre de brucelose canina;
- Todos os animais a serem adquiridos devem resultar não reagentes em dois testes com intervalos de 30 dias entre eles;
- Manter os animais adquiridos em quarentena por 8 a 12 semanas;
- Só adquirir animais que não tenham sido expostos ao agente e que não apresentam sinais clínicos sugestivos da brucelose canina;
- Só permitir o cruzamento dos animais do canil com animais não reagentes aos testes, preferencialmente de canis livres da doença;
- Manter separados e testar todos os animais que foram cruzados por animais externos ao canil 30 dias após a cobertura;
- Se houver participação em exposição e feiras ou cruzamentos com cães externos ao canil, deve ser realizado teste anual de todos os animais púberes do canil (OLIVEIRA, 2005).

Os animais reagentes ou inconclusivos aos testes de triagem devem ser submetidos a testes confirmatórios para se aumentar a especificidade do diagnóstico. Os animais confirmados como infectados devem ser retirados do programa de reprodução e não pode ter contato com o ambiente de animais não reagentes.

O canil só deverá ser considerado livre de brucelose canina após três testes não reagentes consecutivos de todos os cães, com intervalos de 30 a 60 dias. O canil deve

ainda ser monitorado pela realização de testes em todos os animais com intervalos de 3 a 4 meses pelo período de um ano. Em animais de companhia o protocolo é diferente, deve-se promover a castração, principalmente, para eliminar as principais fontes de infecção: a transmissão sexual em ambos os sexos, secreções de cio e aborto/parto, nas fêmeas, e a eliminação na urina, em função da regressão da próstata, nos machos. Pode associar o tratamento com antimicrobianos à castração, mas os animais tratados devem ser submetidos a testes de monitoramento por pelo menos 90 dias após o término do tratamento. De toda a forma, medidas de limpeza e desinfecção devem ser adotadas, para eliminar contaminação ambiental e diminuir risco de transmissão ao homem (OLIVEIRA, 2005).

7 DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

Em função das inúmeras formas clínicas e da pouca especificidade do diagnóstico clínico, a confirmação do diagnóstico de brucelose canina deve ser fundamentada em testes sorológicos viáveis e/ou no isolamento do agente em cultivo. Os cães infectados continuam a ser uma fonte de infecção para outros cães e o homem, parte devido ao contato próximo, parte pelo insucesso do tratamento com antimicrobianos e parte pela natureza intracelular da bactéria, cujo tratamento é, em princípio, desaconselhado ou pela prescrição criteriosa do médico veterinário.

Cães com sinais clínicos de brucelose devem ser submetidos aos testes sorológicos disponíveis para confirmar o diagnóstico clínico por meio da prova do 2ME, principalmente em infecções crônicas. Nos casos agudos é recomendado testes que se baseiam na detecção do antígeno como isolamento e PCR de sangue, descarga vaginal pós-aborto, sêmen e até mesmo a urina. Cães reagentes a esses testes devem ter seus resultados confirmados pelo teste de aglutinação em tubo ou imunodifusão em gelose de agar (NELSON e COUTO, 2010).

Os médicos veterinários devem informar aos proprietários de animais de companhia, guarda e de canis comerciais sobre o potencial zoonótico desta infecção. A doença tem especial importância para criadores de cães, pois interrompe a vida reprodutiva de um animal ou o sentença a morte. Canis que não adotam medidas adequadas no controle da brucelose canina tais como teste antes da reprodução, introdução de cães não reagentes para esta enfermidade, quarentena, monitoramento anual e controle dos índices reprodutivos correm o risco de introduzi-la, resultando em prejuízos sanitários e econômicos significativos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1216-1219, 2005.
- ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.
- ALTON, G.G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris :INRA, 1976. 109p.
- ANGEL, M. O. et al. Serological trail of *Brucella* infection in na urban slum population in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 9, p. 675-679, 2012.
- ARAS, Z; UÇAN, U S. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. **Theriogenology**, v. 74, p. 658-662, 2010.
- AZEVEDO, S. S. et al. 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.
- AZEVEDO, S. S. et al. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 106-112, 2004.
- BADAKHSH, F., CARMICHAEL, L., DOUGLASS, J. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 286-289, 1982.
- BAEK, B. K. et al. The first detection of *Brucella canis* in cattle in the Republic of Korea. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 77-82, 2012.
- BALDI, P. C. et al. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 127-134, 1994.
- BALDI, P. C. et al. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18kDa cytoplasmatic protein of *Brucella* spp. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 2-3, p; 273-281, 1997.
- BARKHA, S.; KUMAR, S. D.; KUMAR, S. D. Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 857-861, 2011.

- BARROIN-MELO, S.M. et al., Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*, **Research in Veterinary Science**. (2007), doi:10.1016/j.rvsc.2007.02.006
- BERTHELOT, X.; BASTUJI, B. G. A brucelose do cão. **A Hora Veterinária**, n. 92, p. 47-50, 1996.
- BEZERRA, R. A. et al. Prevalência de anticorpos contra *Brucella canis* em cães na região de Iheus-Itabuna, Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 27-30, 2012.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Austin: Texas A&M University Press College Station, 1994. p.1053-1066.
- BORIE, C. et al. Description of reproductive characteristics of three *Brucella canis* seropositive dogs. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 34, n. 1, Valdivia, 2002.
- BOUNAADJA, L. et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 156-164, 2009.
- BROWER, A. et al. Newly identified variability in *Brucella canis* fatty-acid content is associated with geographical origin. **Epidemiology & Infection**, v. 141, p. 852-858, jan. 2013.
- CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, p. 1726-34, 1970.
- CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, v. 6, p. 106-116, 1976.
- CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M⁻) organism as antigen. **Cornell Vet**, v. 77, p. 3-12, 1987.
- CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **Cornell Vet**, v. 78, p. 63-73, 1988.
- CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan, J. R (Ed.). **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 335-350, 1990.
- CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis In GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990, p. 573-584.

- CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Brucellosis canina. In: CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. *Enfermedades Infecciosas Perros y Gatos. México, Interamericana:Mcgraw-Hill*, 1993, p. 604-615.
- CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and the cat. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p. 248-257.
- CARMICHAEL, L. E; SHIN, S. J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, v. 11, p. 161-165, 1996.
- CARMICHAEL, L. E. Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermidade clínica; problemas em imunodiagnostico. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 80, p. 102-106, 1998.
- CAVALCANTI, L. A. 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.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC.
<http://www.cdc.gov/brucellosis/veterinarians/dogs.html>
- CURRIER, R. W. et al. Canine brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, p. 132-3, 1982.
- DAMP, S.C.; CRUMRINE, M.H., LEWIS, G.E. Jr. Microtiter Plate Agglutination test for *Brucella canis* antibodies. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 489-490, 1973.
- DEES, S. B. et al. Cellular fatty acids of *Brucella canis* and *Brucella suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, n.24, p.111-112, 1981.
- DELPINO, M.V.; FOSSATI, C.A.; BALDI, P.C. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other Alpha Proteobacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v.11, n.5, p.868–873, 2004.
- DIAZ, R.; JONES, L.; WILSON, J. B. Antigenic relationship of the Gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough *Brucellae*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 618-624, 1968.
- DÓREA, H. C; et al. Discoespondilite em Cão –Infecção por *Brucella canis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, suplemento, 2000.
- DORNELES, E. M. S. et al. Anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães de Araguaína, Tocantins. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 167-171, 2011.
- EBANI, V. V. et al. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. **New Microbiology**, v. 26, p. 65-73, 2003.

- FERNANDES, A. R. F. et al. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1405-1408, 2011.
- FERNANDES, N. C. F. et al. Pesquisa de *Brucella canis* e *Brucella abortus* em soro de cães atendidos no Projeto Vida Digna. **Anais do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA**, 26 à 29 de setembro de 2012.
- FERREIRA, T. et al. Brucelose canina, ocorrência em um canil comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p.555-556, 2003.
- FLORES-CASTRO, R.; SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. **Cornell veterinarian**, v. 66, p. 347-352, 1976.
- FOSTER, J. T. et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. **Jornal of Bacteriology**, v. 191, n. 8, p. 2864-2870, 2009.
- GEORGE, L. W.; DUNCAN, J. R.; CARMICHAEL, L. Semen examination in dogs with canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 1589-95, 1979.
- GEORGE, L.; CARMICHAEL, L. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. **American Veterinary Research**, v. 45, n. 2, p. 274-281, 1984.
- GOMES, M. J. P. et al. *Brucella canis*: isolamento em um cão com epididimite e orquite – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v. 4, n. 18, p.17-20, 1999.
- GREENE, C. E.; GEORGE, L.W. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of Dog and Cat**. Philadelphia: 1984, p. 646-662.
- HOLLETT, B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v.66, p.575-587, 2006.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROCARYOTES: SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF *Brucella*. Disponível em: <<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>> Acesso em: 05 de maio de 2013
- JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Small Animal**, v. 14, n. 6, p. 763-772, 1992.
- KAZMIERCZAC, J. et al. Summary findings and recommendations of the *Brucella canis* workgroup. **Public Health Implications of *Brucella canis* Infections in Humans**, 2012.
- KEID, L. B. et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, p. 1203-1210, 2007.
- KEID, L. B. et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v. 68, p. 1260-1270, 2007.

KEID, L. B. et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological testes and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary Research Communications**, 2007.

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos no diagnostico da brucelose em cães naturalmente infectados**. 2006.134f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses - Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cipedya.com/doc/169084>>. Acesso em: 19 abril de 2013.

KIM, S.; LEE, D.S.; SUZUKI, H.; WATARI, M. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canina sêmen by multiplex nested PCR. **Japan Veterinary Medicine Science**, v. 68, n. 6, p. 625-618, 2006.

KIM, J.W. et al. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, p. 1103-1107, 2007.

KÖSE, S. et al. Presentation of two cases diagnosed with *Brucella* endocarditis. **Internal Medicine**, v. 51, p. 953-5, 2012.

LARSSON, M. H. M. A. et al. *Brucella canis*. Inquéritos sorológico e bacteriológico em população felina. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p. 47-50, 1984.

LAWACZECK, E. et al. *Brucella canis* in a HIV-infected patient. **Zoonoses Public Health**, v. 58, p. 150-152, 2011.

LEDBETTER, E. C. et al. *Brucella canis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis and treatment. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 3, p. 183-191, 2009.

LUCERO, N. E. et al. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 656-660, 2002.

LUCERO, N. F. et al. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.457-461, 2005.

LUCERO, N.F. et al. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 505-508, 2005.

LUCERO, N.F. et al. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 280-285, 2010.

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

- MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTÍN, M.; CASAL, J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 6, p. 257-259, 1994.
- MARASSI, C. D.; MORAES, I. A.; LILENBAUM, W. Comparação entre antígenos de *B. canis* e de *B. ovis* para o diagnóstico da brucelose canina em testes de imunodifusão em Gel-agarose. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 103-107, 2004.
- MARZETTI, S. et al. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 55-61, 2013.
- MEGID, J. et al. Serology and therapeutic efficacy of riphampicyn and streptomycin in dogs naturally infected with *Brucella canis*. In: CONGRESS OF THE WORD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23, 1998, Buenos Aires. Proceedings., Buenos Aires: 1998. p.814
- MEGID, J. et al. Avaliação epidemiológica da brucelose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 5, 1999.
- MEGID, J. et al. Perfil sorológico, isolamento bacteriano e valores hematológicos e urinários em cães naturalmente infectados com *Brucella canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 405-409, 2000.
- MEGID, J. et al. Brucelose canina - relato de caso. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 103-106, 2002.
- MEGID, J. et al. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 117-126, 2010.
- MINHARRO, S. et al. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 3/4, p. 167-173, 2005.
- MOORE, J. A.; BENNET, M. A previously undescribed organism associated with canine abortion, **Veterinary Record**, v. 80, p. 604-605, 1967.
- MOORE, J.A.; GUPTA, B.N. Epizootology, diagnosis and control of *B. canis*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 156, n. 12, p. 1737-1740, 1970.
- MORAES, C. C. G. et al. Prevalência da brucelose canina na microrregião da serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.
- MORAES, C. C. G. et al. Imunodifusão em gel de Agar e soroaglutinação rápida para a detecção de anticorpos anti-*Brucella canis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 34-43, 2009.

MORAES, C. C. G.; PAZ, G. S. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella canis* e *Brucella abortus* em cães oriundos da região metropolitana de Belém e do município de Castanhal, Estado do Pará. **Seminário de Iniciação Científica da UFPA**, v. 22, n.1, 2011.

MORENO, E. et al. Immunochemical Characterization of Rough *Brucella* Lipopolysaccharides. **Infection and Immunity**, v.43, n.3, p.779-782, 1984.

MORENO, E.; CLOERCKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 209 – 227, 2002.

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

MYERS, D. M. 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.

NCBI Taxonomy. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>. Acesso em 05 de abril de 2013.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Elsevier: São Paulo. 2010, p.936-938.

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

NIELSEN, K. H. et al. Competitive enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella* lipopolysaccharid. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 1 , n. 4, p. 305–314, 2007

OLIVEIRA, H. P. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia**, CRMV-MG, Belo Horizonte, n. 47, 2005.

OLIVEIRA, M. Z. D. et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 425-431, 2011.

OLIVERA, M.; GIRALDO, C.A.; DI-LORENZO, C. Identificación por PCR de *Brucella canis* em sangue y leche canina. Reporte de um caso. **Archivos de Medicina Veterinaria**, vol. 43, p 295-298, 2011.

PORTO, W. J. N.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 6-9, 2008.

POESTER, F. P. et al. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 55-62, 2012.

REGUERA, J. M. et al. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic and therapeutic approach. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 647-50, 2003.

REYNES, E. et al. Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, p. 533-537, 2012.

ROXO, E. et al. Relato de uma possível transmissão de *Brucella canis* ao homem a partir de uma cadela da raça Doberman. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.55, n.19, 1990.

SALGADO, V. R. et al. Avaliação do cultivo microbiológico de aspirados de medula óssea e sangue no diagnóstico da brucelose canina. **Biológico, São Paulo**, v. 68, Suplemento, p. 104-107, 2006. (resumo expandido) **Pubvet, Botucatu**, v.2, n.24, p.66-71, 2008.

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

SHIN, S.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. **Recent Advances in Canine Infectious Disease**. International veterinary Information Service. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/ivis.pdf

SILVA, L. C. et al. Serological detection of *Brucella canis* in shelter dogs from Northern Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2391-2393, 2012.

SILVA, C. P. A. S. et al. Detecção molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado do Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.6, 2012.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.

TOSI, M.F; NELSON, T.J. *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam. **Clinical and Laboratory Observations**, v. 101, n. 5, p. 725-727, 1982.

VASCONCELOS, R. T. J. et al. 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.

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

WALD, V.B. & FERNANDES, J.C.T. Sorologia da Brucelose canina no Município de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.4/5, p.92-95, 1976.

WALLACH, J.C. et al. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, 2004.

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

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

WANKE, M. et al. Preliminary study of an immunochromatography test for serological diagnosis of canine brucellosis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 370-372, 2012.

WANG, Y. et al. Complete genome sequence of *Brucella canis* BCB018, a strain isolated from a human patient. **Journal of Bacteriology**, v. 23, n. 194, p.6697, 2012.

WHATMORE, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1168-64, 2009.

WATARAI, M. et al. A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 5, p. 477-480, 2007.