

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

**Detecção e identificação de *Brucella* spp em cães da região do Pantanal Sul
Matogrossense**

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL
SETEMBRO, 2015

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

**Detecção e identificação de *Brucella* spp em cães da região do Pantanal Sul
Matogrossense**

Autora: Ana Laura Bello de Oliveira
Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira
Co-Orientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade".

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

Oliveira, Ana Laura Bello de
O48d Detecção e identificação de *Brucella* spp. em cães na região do Pantanal Sul Matogrossense Ana Laura Bello de Oliveira; orientação Carina Elisei de Oliveira; coorientação Cristiano Marcelo Espínola Carvalho – 2015.
84 f.

Dissertação (mestrado em ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

1. Cão - Doenças 2. Brucelose 3. Sorologia I. Oliveira, Carina Elisei de II. Carvalho, Cristiano Marcelo Espínola III. Título

CDD – 636.70896



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Valorizando talentos

**Deteção e Identificação de Brucella spp. em Cães na Região do Pantanal Sul
Matogrossense**

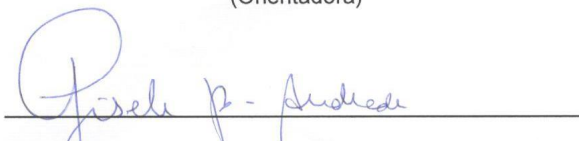
Autor: Ana Laura Bello de Oliveira
Orientador (a): Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária
Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva

APROVADA em 14 de Setembro de 2015.



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB
(Orientadora)



Profa. Dra. Gisele Braziliano de Andrade - UCDB



Profa. Dra. Gracia Maria Soares Rosinha - EMBRAPA



Profa. Dra. Jania de Rezende - UCDB

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém” - Dalai Lama

Dedico esse trabalho a Deus.
E a minha mãe Dione, minha maior incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira pela oportunidade, orientação, ensinamentos e principalmente pela paciência.

A minha mãe Dione, pelos cuidados comigo, pelo apoio, por tudo de bom que a senhora me proporcionou até hoje mãe, por ajudar a realizar meu maior sonho, que é o de ser médica veterinária. Te amo muito.

Aos meus irmãos Marcino e Márcio que passaram poucas e boas ao meu lado, com meus estresses do dia a dia, desculpem me, amo vocês.

Ao meu pai e a família Oliveira que entenderam minha ausência nesses dois anos.

A Profa Dra. Lara Borges Keid, pelas cepas cedidas, pela hospitalidade, oportunidade e aos ensinamentos transmitidos, na USP de Pirassununga.

A Profa. Dra. Grácia Maria Rosinha, pelas cepas cedidas e o material para preparo do meio de cultura.

A Cristiane Sanches, pelas dicas com o preparo do meio de cultura e por me ajudar com algumas dúvidas que tive durante esse período.

Aos meus amigos, que suportaram minhas chatices, perturbações e ausências. Cleber Galvão, o querido “Binho” e Halliny Galvão minha família da faculdade, sempre me dando força, meus irmãos de alma. Jéssica Scaff, minha chata preferida. A amiga irmã Kelly Dorotéia, que mesmo de longe torce por mim. As amigas “Xipas”; Andréia Faustino, Tatiana Carvalho, Juliana Quintana, Raíssa Valadares. “Pronto! Estou de volta!”

A minha amiga irmã, parceira das madrugadas em claro tentando desvendar os segredos da sustentabilidade. Paula Helena Santa Rita. “Paulinha Gracie”, obrigada pelos conselhos e puxões de orelha. Missão dada é missão cumprida! “OSS”.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Veterinário, nosso HOVET, que me deram muita força durante todo esse período.

A querida Daniele Bier, pela ajuda com os bioquímicos. Professor Dr. Heitor Herrera e equipe, pelas coletas no Pantanal. Diogo, Núbia, Luciano, Magyda, Ricardo, Rosalia e Antônio Paulo, pelas dicas e sugestões.

A Maria Helena, Miriã, Dayane, Jania Rezende e Fernando, equipe do S-Inova, por toda a ajuda que me deram no laboratório.

A uma turminha especial em especial de mestrandos; as meninas da biologia: Jhéssyca Leal e Andreza Leão e aos meus ex-alunos: Gabriel Macedo, João Campos, pela super ajuda com as coletas e com o experimento. Ao Jean Zimmer do PIBIC, pela ajuda na reta final. A Wanessa Barreto pela ajuda com a ortografia.

A grande responsável por tudo isso, minha amiga Laura Raquel Rios Ribeiro. Querida Laurinha, serei eternamente grata a você por acreditar em mim, mais do que eu mesma muitas vezes. “Talvez a maior parte do tempo”. Te amo, amiga. Te amo, irmã.

E por último, aos animais que são o motivo de eu ter escolhido a minha profissão e que nos forneceram material para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ii
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Características biológicas e morfológicas de bactérias do gênero <i>Brucella</i>	5
3.2. Características de patogenicidade.....	6
3.5 Diagnóstico.....	13
3.5.1 Diagnóstico sorológico empregados na detecção de anticorpo anti - <i>Brucella</i> . 13	
3.5.2 Diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase.....	17
3.5.3 Profilaxia e Tratamento.....	20
5. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1.....	33
CAPÍTULO 2.....	46
APÊNDICE.....	61
APÊNDICE 1 - Tabela de resultados.....	61
APÊNDICE 2 - NORMAS DA REVISTA.....	66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 Tabela 1. Frequência das amostras reagentes à prova do AAT e IDGA.....	39
Capítulo 2 Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para realização da técnica PCR.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida e transmissão de <i>B. abortus</i> . (adaptado de MORENO, 2014).	9
Figura 2: Distribuição geográfica de <i>B. canis</i> . (relatos de casos clínicos e de inquérito sorológico) A: relatórios (incluindo inquéritos sorológicos) indicam que a infecção é endêmica. B: Poucos casos clínicos ou surtos em canis foram descritos C: inquéritos sorológicos indicam que a soroprevalência é baixa (adaptado de HOLST et al., 2011).	10
Capítulo 2 Figura 1. Eletroforese do produto de PCR - Agarose 2%. (1) Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®). Com os primers BruAb2_0168, (2-5) amostras positivas de cães para <i>B. abortus</i> ; (6): Controle positivo; (7): Controle negativo. 50	
Capítulo 2 Figura 2. Alinhamento múltiplo de sequencias do gene <i>bscp 31</i> de <i>Brucella</i> . <i>Brucella</i> sp. (isolado de cães - animais 03, 09 e 11) e <i>B. canis</i> , <i>B. abortus</i> e <i>B. suis</i> do GenBank.....	52
Capítulo 2 Figura 3. Filogenia de <i>Brucella</i> spp. utilizando-se o gene <i>bcs p 31</i> , pelo método de Neighbor-joining, modelo Jukes-Cantor Bootstrap 1000.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT – antígeno acidificado tamponado
C-Elisa – ensaio de imunoadsorção enzimática competitiva
DNA – ácido desoxirribonucléico
2-ME – Dois mercapto etanol
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
Elisa – ensaio de imunoadsorção enzimática
IDGA – Imunodifusão em gel de ágar
FC – fixação do complemento
g - grama
HCl – ácido clorídrico
H₂S – Sulfeto de hidrogênio
IgG – imunoglobulina G
IgG1 – imunoglobulina G1
IgM – imunoglobulina M
ITS – elemento espessador entre as sequências codificadoras das unidades ribossômicas 16S e 23S
I-Elisa – Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
µm – micrômetro
µL - microlitro
OIE – organização internacional de epizootias
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
pb – pares de base
pmoles – pico moles
rpm – rotações por minuto
SAL – soroaglutinação lenta
SAR – soroaglutinação rápida
Taq – *Thermus aquaticus*
TBE – Tris borato EDTA
TE – Tampão tris-EDTA
V – volts
X – vezes

RESUMO

A brucelose é uma zoonose, infecto-contagiosa, endêmica, ocasionada por bactérias coco-bacilos, gram-negativas pertencentes ao gênero *Brucella*, os cães, assim como os bovinos quando infectados estão sujeitos a problemas reprodutivos, tais como: abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade. Objetivou-se com este estudo, detectar e identificar espécies de *Brucella* que infectam cães em área endêmica para Brucelose. Para isto, foram colhidas amostras de sangue, sem e com anticoagulante, de 168 cães procedentes da região do Pantanal Sul Matogrossense. As amostras colhidas sem anticoagulante foram processadas para a realização dos testes sorológicos por imunodifusão em ágar gel (IDGA). Foi possível detectar uma frequência de 6,83% (8/117) animais positivos anti - *Brucella canis* e para o antígeno acidificado tamponado (AAT) foi de 10,20% (15/147) de positivos anti *B. abortus*. As amostras de sangue com anticoagulante foram submetidas à extração de DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR), das 168 amostras analisadas foi possível detectar 43,45% (73/168) de animais positivos utilizando se os pares de *primers* B4/B5, 41,66% (70/168) de animais positivos no IS711 que são *primers* para *Brucella* spp. e 10,71% (18/168) de amostras positivas no *primer* BruAb_0168 para *B. abortus*. Também foram testados *primers* específicos para *B. canis*, entretanto não obteve-se amostras positivas. Com o estudo foi possível detectar a anticorpos anti *B. canis* e *B. abortus* e também a presença de DNA de *Brucella* em amostras de sangue de animais provenientes de área endêmica para brucelose.

Palavras-chave: Brucelose canina, sorologia, PCR, Zona rural.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by gram-negative bacteria of the genus *Brucella*, and endemic in cattle in Pantanal region. The dogs, as well as cattle, when infected, are subject to reproductive disorders, such as abortion, still births and infertility. The aim of this study was the detection and identification of *Brucella* species that infect dogs in Pantanal. For this purpose, whole blood and serum samples were collected from 168 dogs from the region. Serum samples were submitted to agar gel immunodiffusion test (AGID) to *B. canis* and buffered acidified antigen (BAA) to *B. abortus*, and samples of whole blood, after DNA extraction, were subjected to the polymerase chain reaction (PCR) using different molecular markers. It was detected a seroprevalence of 6.83% (8/117) in the AGID test and a seroprevalence of 10.20% (15/147) in the AAT test. Of the 168 samples submitted to PCR, we detected a positivity of 43.45% (73/168) using the primer B4 / B5, 41.66% (70/168) for the primer IS711, and 10.71% (18/168) using the primer BruAb_0168. Also we tested specific primers for *B. canis*, however no sample was reagent to the test. With this study was possible to detect the presence of antibodies against *B. canis* and *B. abortus* and the presence of *Brucella* DNA in whole blood samples of dogs from an endemic area for brucellosis.

Palavras-chave: Canine brucellosis, serology, PCR, countryside.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*, que infectam os animais domésticos, silvestres e seres humanos (NICOLETTI, 1989). É uma das doenças infecciosas de maior impacto econômico na medicina veterinária, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a *World Health Organization* (WHO) e *Office International de Epizooties* (OIE), a brucelose é ainda uma das mais importantes zoonoses disseminada no mundo (OIE, 2012).

As espécies de *Brucella* podem ser classificadas de acordo com a associação entre patógenos-hospedeiros: *Brucella melitensis* em caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos); *B. abortus* em bovinos (bubalinos, cervídeos, canídeos e seres humanos); *B. ovis* em ovinos, *B. suis* em suínos, *B. neotomae* em ratos do deserto, *B. canis* em canídeos (seres humanos) (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984), *B. ceti* (golfinhos e baleias) e *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos) (FOSTER et al., 2007) e *B. microti* (roedores e canídeos selvagens) (SCHOLZ et al., 2008) e *B. inopinata* uma espécie nova em seres humanos (SCHOLZ et al., 2010).

As bactérias do gênero *Brucella* são divididas em dois grandes grupos morfológicos, de acordo com a composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular, sendo caracterizadas por colônias lisas ou rugosas. A molécula de LPS das colônias lisas apresenta-se completa e é composta por três domínios: porção imuno-dominante externa, denominada de antígeno-O; o núcleo de oligossacarídeos; e a porção glicolípídica interna, denominada de lipídeo A (GODFROID et al., 2002). O antígeno-O é composto de homopolímeros de 4,6 dideoxi 4-formamida-alfa-D-mamipiranosil, e nas colônias de morfologia rugosas esta porção é ausente.

Um dos fatores de virulência de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* que apresentam morfologia do tipo lisa, é conferido pelo antígeno O, que é responsável pela proteção contra os agentes hidrofóbicos, protege da lise mediada pelo complemento e confere resistência a morte por grânulos microbicidas intracelulares de leucócitos polimorfonucleares (GODFROID et al. 2002).

As espécies *B. ovis* e *B. canis* apresentam fenótipo do tipo rugoso ou mucóide, determinando assim sua morfologia colonial (BRASIL, 2006). Entretanto essas bactérias, apesar de serem rugosas, são extremamente patogênicas aos seus hospedeiros naturais, indicando que o antígeno-O do LPS não é o único fator necessário para a virulência de *Brucella* (GODFROID et al. 2002).

A brucelose canina é considerada uma zoonose de importância em saúde pública (CARMICHAEL; KENNEY, 1968), causada por *B. canis*. Os canídeos domésticos e silvestres são susceptíveis, ocasionando nestes hospedeiros perdas reprodutivas; como abortos em fêmeas gestantes e epididimites e orquites em machos (MIRANDA et al. 2005, MEGID et al. 2007, KEID et al. 2004).

No Brasil, são realizados estudos com intuito de identificar, isolar o agente (GODOY et al., 1977; KEID, 2001) e inquéritos sorológicos (AZEVEDO et al., 2003; MEGID et al., 2007, BEZERRA et al., 2012) enfatizaram a importância clínica e epidemiológica do agente na população canina. O caráter zoonótico de *B. canis* também deve ser considerado, devido aos relatos clínicos em seres humanos (ROXO et al., 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998). Outras espécies de *Brucella*, como *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* foram ocasionalmente associadas com a brucelose nos cães (BRICKNELL et al., 1976; SANDOVAL et al., 1976; BARR et al., 1986; MIRANDA et al., 2005; MEGID et al., 2006; OIE, 2012).

Entretanto, a infecção natural de cães por *B. abortus* é de ocorrência esporádica e geralmente resulta do contato estreito de cães, com bovinos infectados em áreas rurais (MEGID et al., 2006). Os cães podem se infectar por contato ou ingestão de produtos de origem animal, restos placentários ou de fetos abortados infectados (CARMICHAEL; GREENE, 1998; AZEVEDO et al., 2003; MIRANDA et al., 2005; CORRENTE et al., 2010). Os cães parecem ser mais resistentes à infecção por brucelas lisas, sendo raras as manifestações clínicas decorrentes da infecção (AZEVEDO et al., 2003), porém quando associadas a outras infecções ou com relação ao estado imunológico e nutricional dos animais, estes podem apresentar

linfadenopatia, abortamentos, orquites, epididimite e lesões articulares (BRICKNELL et al., 1976).

A identificação dos cães infectados por *B. abortus* é importante, pois esses animais podem constituir fontes de infecção, eliminar o agente no ambiente pela urina, por ejaculados, por secreções vaginais, por fetos abortados ou pelas fezes (FORBES, 1990; BAEK et al., 2003).

O impacto da transmissão de patógenos entre animais silvestres e domésticos ainda é pouco conhecido. Apenas em longo prazo por meio da investigação dos animais silvestres e domésticos que habitam a mesma região ajudarão a identificar o reservatório natural de doenças em áreas endêmicas, criando oportunidades de medidas preventivas (TRUONG et al, 2001). Estudos epidemiológicos têm mostrado diferenças na patogenicidade e na taxa de transmissão de *Brucella*, sugerindo uma veiculação entre os animais domésticos e silvestres (GODFROID, 2002). Há relatos que os canídeos domésticos e silvestres podem ser reservatórios das espécies de *Brucella*. Por consequência, o conhecimento sobre a prevalência de *Brucella* nos canídeos é crucial para o controle da brucelose nos bovinos no Pantanal Sul Matogrossense.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Dedeterminar a frequência de anticorpos anti *Brucella canis* e *Brucella abortus* e a presença de DNA de espécies de *Brucella* presentes em cães residentes na região do Pantanal Sul Matogrossense.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Detectar os animais infectados por métodos sorológicos e PCR,
- ✓ Identificar as espécies de *Brucella* por sequenciamento e,
- ✓ Determinar o posicionamento dos fragmentos sequenciados dentro do grupo das espécies de *Brucella*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O primeiro isolamento de *Brucella* sp. foi realizado por David Bruce, na Ilha de Malta, de militares ingleses que apresentavam os sintomas da "Febre do Mediterrâneo", segundo Bruce (1887 apud POESTER, 2013). Após identificação dos cocos-bacilos gram-negativos, Bruce denominou-os de *Micrococcus melitensis*. Desde o início da história desta enfermidade, as características zoonóticas já haviam sido observadas, pois a relação com o consumo de leite cru e o desenvolvimento dos sintomas de febre eram fatos conhecidos. Naquela época, David Bruce, um físico do Exército Real da Inglaterra, alertara as autoridades sanitárias dos EUA, durante uma importação de cabras da Ilha de Malta, sobre os potenciais riscos desta doença (BRUCE, 1893). Em homenagem a Bruce, a espécie foi renomeada *Brucella melitensis*. Conforme Bang (1897 apud POESTER, 2013) fez o primeiro relato sobre o isolamento de *B. abortus* a partir de vacas que abortaram.

3.1. Características biológicas e morfológicas de bactérias do gênero

Brucella

As bactérias representantes do gênero *Brucella* são gram-negativas, cocobacilos curtos (0,6 – 1,5 µm x 0,5 – 0,7 µm), aeróbicas, imóveis, não formadoras de esporos, intracelulares facultativas, microaerófilas, pleomórficas, caracterizadas pela infecção do sistema mononuclear fagocitário, acometendo seres humanos e várias outras espécies de mamíferos (ALTON et al., 1988). O gênero *Brucella* pertence a subdivisão Alpha das Proteobactérias, que são bactérias que vivem com animais e plantas (MORENO; MORIYON, 2002).

O genoma de *Brucella* é composto por dois cromossomos circulares, geralmente de 2,1Mb e 1,15Mb, sem a presença de plasmídeos (OUAHRANI et al., 1993). A presença de dois cromossomos, e não de apenas um cromossomo e um plasmídeo é sustentada devido ao fato de ambos *replicons* conterem genes que são essenciais à sobrevivência destas bactérias (VIZCAÍNO et al., 2001).

O gênero *Brucella* é altamente conservado e homogêneo em nível genômico, com todas as espécies apresentando acima de 97% de homologia em estudos de hibridização DNA-DNA (VERGER et al., 1985). Entretanto, as espécies de *Brucella* podem ser diferenciadas através do polimorfismo de um simples nucleotídeo (SNP) e pelas características de virulência e preferência por hospedeiros (MORENO, 2014).

As espécies de *Brucella* podem ser identificadas por meio de uma bateria clássica de ensaios bioquímicos também baseados em diferentes características (CORBEL, 1997).

A identificação dos agentes causadores da brucelose é um dos pontos essenciais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) e os métodos de confirmação direta são de extrema importância na identificação de focos da doença, bem como na caracterização do agente, das cepas e biovars envolvidos.

3.2. Características de patogenicidade

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* apresentam características peculiares de resistência ao hospedeiro, induzindo infecções crônicas e persistentes, sobrevivendo e se multiplicando dentro de células fagocíticas (OLIVEIRA et al., 2002; SEXTON; VOGEL, 2002).

Assim como nos bovinos acometidos por *B. abortus*, nos cães infectados por *B. canis* também podem ocorrer alterações reprodutivas. Nas fêmeas predominam os abortos e os natimortos, a maioria dos abortos ocorre tardiamente, durante a sétima e nona semana de gestação. Os sinais clínicos ocorrem durante gestações subsequentes em alguns cães (WANKE, 2004; MEGID, 2010; OIE, 2012).

Brucella canis pode causar infertilidade nos machos. O esperma pode ter anormalidades morfológicas e viabilidade reduzida. Edema, epididimite escrotal e orquite podem ser observadas. Dermatite escrotal pode ocorrer devido à auto-trauma e a atrofia testicular unilateral ou bilateral são relatadas em infecções crônicas, e alguns machos tornam-se inférteis (WANKE, 2004; OIE, 2012; POESTER; SAMARTINO; SANTOS, 2013).

Linfadenite é comum nos cães infectados; os linfonodos retrofaríngeos podem aumentar de tamanho após a infecção oral, e os linfonodos ilíacos superficiais inguinais e externo após a infecção vaginal. Alguns sintomas são ocasionalmente relatados incluindo letargia ou fadiga, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, perda de peso e anomalias comportamentais, como perda de atenção e mau desempenho de tarefas. No entanto, a maioria dos cães afetados são assintomáticos (OIE, 2012). Hepatomegalia e distúrbios na citologia hepática, tais como granulomas dentro do parênquima, podem ocorrer (AKRITIDIS et al., 2007).

Os cães com brucelose podem recuperar-se espontaneamente a partir de um ano após a infecção, mas a recuperação é mais comum em 2 a 3 anos, sendo que alguns cães podem permanecer cronicamente infectados por pelo menos cinco anos. As mortes são raras, exceto no feto ou recém-nascido. O número de animais assintomáticos pode ser alto, os quais podem atuar como fontes de infecção para outros animais ou para as pessoas (WANKE, 2004; CASTRILLÓN-SALAZAR et al., 2013).

3.3. Resistência e transmissão de *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* são resistentes aos intemperes ambientais; estas bactérias podem permanecer períodos de aproximadamente seis meses em material de aborto ou parto nas pastagens. A permanência destas bactérias no ambiente aumenta em determinadas condições como a presença de sombra, umidade e baixas temperaturas. Desta forma, a exposição ao sol é recomendada principalmente em locais com altas taxas de contaminação ambiental, devido ao seu potencial bactericida (BRASIL, 2006). Um dos mecanismos de transmissão de *Brucella* é por via oral (CRAWFORD et al., 1990; ACHA; SZYFRES, 2003). Durante o aborto e parto de animais infectados é eliminada uma grande quantidade de bactéria e, além disso, estes animais continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias.

Os hábitos dos animais de lambar e cheirar os recém nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas, favorecem a transmissão da brucelose. Os machos de bovinos apresentam uma pequena importância na transmissão da brucelose durante a monta natural, pois a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção (CAMPERO, 1993). No processo de

reprodução assistida o sêmen infectado por *B. abortus* é altamente infeccioso por ser depositado diretamente no útero, livre das barreiras (CAMPERO, 1993).

Um dos fatores de risco para a brucelose é a introdução de animais infectados em rebanhos livres e, conseqüentemente, o aumento da frequência de animais infectados. além disso, a não exigência de atestado negativo para brucelose dos animais adquiridos favorecem a introdução da doença (POESTER et al., 2005).

Para isso, deve-se adquirir animais de propriedades livres de brucelose, pois, quando esses são adquiridos de propriedades que tenham animais com a doença, mesmo que sejam negativos sorologicamente, há o risco de estarem em período de incubação (POESTER et al., 2005). Outros fatores, como a ausência ou baixa taxa de vacinação, o grande tamanho e alta densidade de alguns rebanhos e a demora na eliminação dos animais infectados, propiciam a maior transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (NICOLETTI, 1989; CRAWFORD et al., 1990; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

As espécies de *Brucella* são sensíveis à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, que devem ser utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e ambientes contaminados (CRAWFORD et al., 1990).

O ciclo de transmissão de *B. abortus* pode ocorrer de várias formas e os seres humanos podem infectar-se com a bactéria por meio da ingestão de produtos lácteos não pasteurizados (Figura 1). A pasteurização ou fermentação de produtos lácteos elimina as bactérias e o risco da infecção em humanos. As Infecções cruzadas entre os animais selvagens e domésticos podem manter as bactérias no ambiente e apresentam relevância epidemiológica. Os seres humanos e outros animais são considerados “dead end” para a bactéria e, portanto, não apresentam relevância epidemiológica.

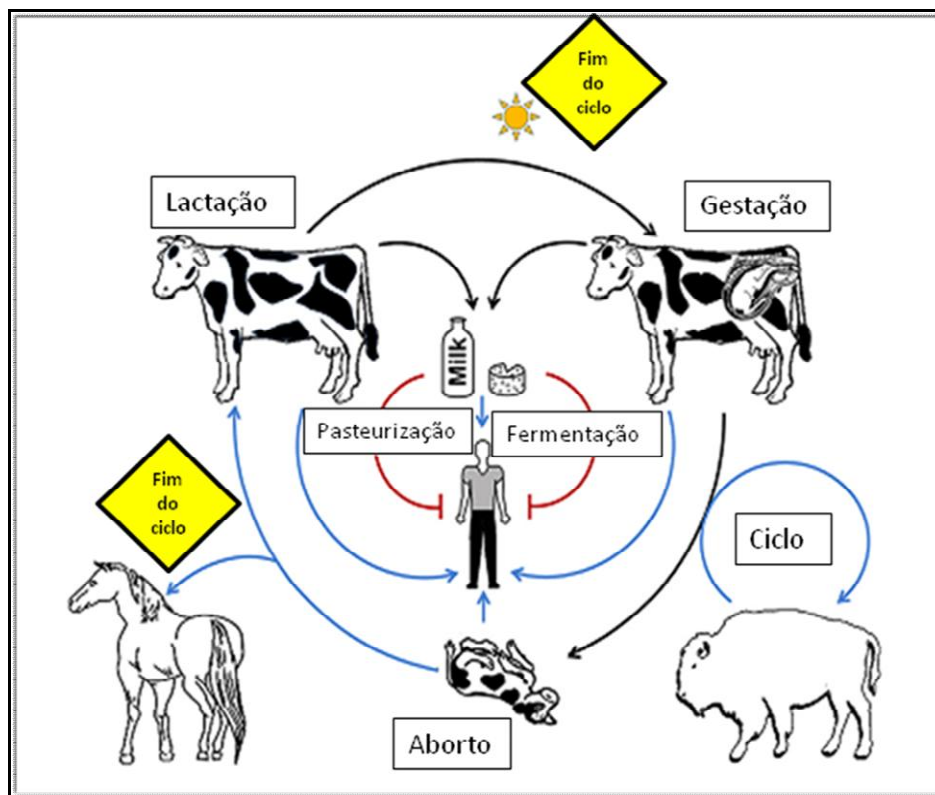


Figura 1. Ciclo de vida e transmissão de *B. abortus*. (adaptado de MORENO, 2014).

3.4. Prevalência da Brucelose canina e bovina e a sua importância epidemiológica

A brucelose canina é ocasionada principalmente pela bactéria *B. canis*, a qual apresenta-se amplamente distribuída (Figura 2). Atualmente esta doença tem sido descrita nas Américas Central e do Sul, sudeste dos Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Ásia (Japão, Índia, Filipinas, Coreia, China, Malásia e Taiwan), África (Nígeria) e Europa (HOLST et al., 2011). Vários surtos têm sido relatados nos últimos anos na Coreia e Suécia (KANG, 2014; CASTRILLÓN-SALAZAR, 2013), e sugere que as infecções por esta espécie pode ter aumentado devido ao crescimento e desenvolvimento da indústria dos *pets*.

Nos EUA, o comércio de cão levou à uma propagação da infecção, ocorrendo uma necessidade crescente de instrumentos de regulação. Na Geórgia, cães infectados com *B. canis* foram identificados e uma estratégia de controle foi adotada (HOLLETT, 2006).

Na Europa o número de caso é baixo, entretanto estes casos podem não ter sido registrados, pois *B. canis* não é de notificação obrigatória à Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), nem para a União Européia (UE), os cães errantes na Área do Mediterrâneo podem atuar como reservatórios. Nos últimos anos o número de casos publicados com infecção por *B. canis* aumentou nesta região (KANG, 2014).

Na Finlândia, a infecção foi diagnosticada a partir de cães que foram importados da Rússia. O primeiro surto de *B. canis* na Hungria foi em 2011 em um canil, e casos de caninos machos foram relatados na Itália e Alemanha. A infecção por *B. canis* foi descrita em três cadelas da raça Poodle na Áustria. Os anticorpos contra *B. abortus* e *B. canis* foram descritos em um cão macho na Polônia. Evidências sorológicas mostram a ocorrência de *B. canis* em vários países da Europa (HOLST et al., 2011).

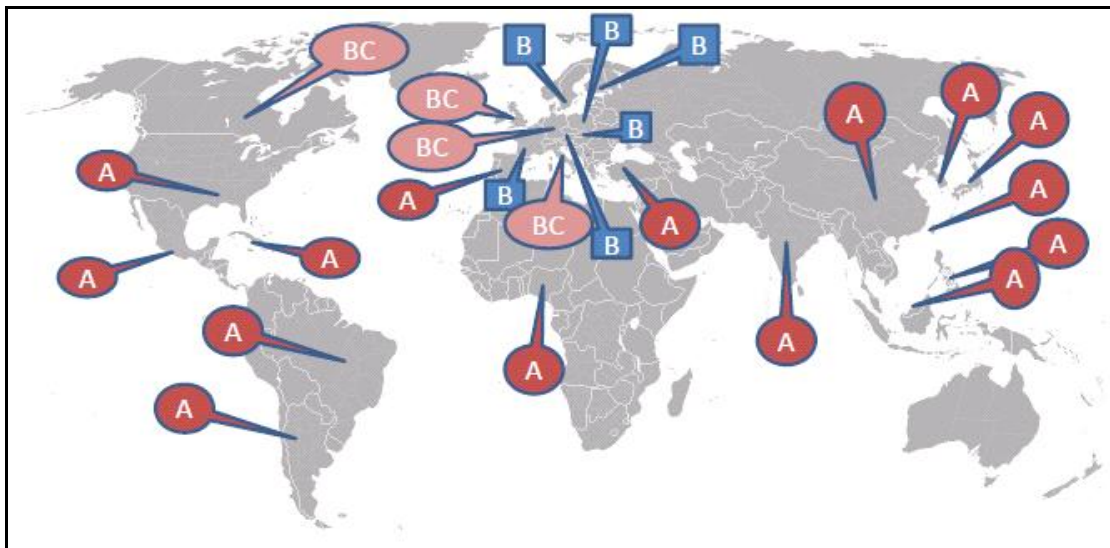


Figura 2: Distribuição geográfica de *B. canis*. (relatos de casos clínicos e de inquérito sorológico) A: relatórios (incluindo inquéritos sorológicos) indicam que a infecção é endêmica. B: Poucos casos clínicos ou surtos em canis foram descritos C: inquéritos sorológicos indicam que a soroprevalência é baixa. Adaptado de HOLST et al., 2011.

A importância dos estudos epidemiológicos demonstra que a infecção por *B. canis* está disseminada. Estudos soroepidemiológicos realizados no Brasil apresentam frequência de anticorpos de *B. canis* entre 0,84% (MORAES; MEGID; SOUZA, 2002) e 58,3% em cães (FERREIRA et al., 2007). Porém, esses dados não podem ser comparados por haver diferenças no delineamento amostral, uma vez que estes dados variam desde relatos de casos em criatórios de cães (*canis*) a levantamentos de prevalência em animais de companhia e errantes (MIRANDA, et al., 2005)

Estudos sobre a prevalência da brucelose canina alerta os criadores de cães para a necessidade de impedir a entrada do agente patogênico causador da brucelose nos canis comerciais e a importância de identificar precocemente os animais infectados. Principalmente quando ocorre histórico de fêmeas que abortaram no final da gestação ou de animais com baixo desempenho reprodutivo, para diminuir as perdas econômicas para os criadores de cães e também evitar a infecção em humanos (CASTRILLÓN-SALAZAR, 2013).

O diagnóstico correto das infecções por *B. canis* é fundamental para o controle e manutenção da doença nos canis mantendo-os livre da doença. Entretanto, a brucelose canina não é frequentemente diagnosticada em virtude das dificuldades encontradas no diagnóstico (FLORES-CASTRO et al., 1977).

A presença de outras espécies de *Brucella* infectando os cães tem sido descritas por outros autores. Baek et al., 2003 relatam a presença de *B. abortus* em cães que convivem com outros animais infectados em ambientes rurais. Os autores ressaltam que em regiões onde a prevalência da brucelose bovina é alta seria prudente manter os cães longe destas fazendas, ou inclui-los no programa de controle e erradicação. Além disso, propõem que os cães poderiam ser valiosos indicadores (sentinela) de *Brucella* em regiões endêmicas para brucelose bovina.

O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 209 milhões de cabeças e revela avanços nos índices de produção, com destaque para a produtividade e para a exportação de seus produtos (IBGE, 2014). No ano de 2013, as exportações brasileiras de carne bovina *in natura* e industrializadas somaram em torno de 1,5 milhões de toneladas que foram comercializadas em cerca de 200 países nos cinco continentes (ABIEC, 2014). Mas, para aumentar ainda mais seus índices de

produtividade se faz necessário investimentos na melhora da qualidade de seus produtos, principalmente a sanitária. A rastreabilidade e os programas voltados para a sanidade animal envolvendo o controle e erradicação de doenças através de vacinações, tratamentos e profilaxia, são requisitos fundamentais para que o país possa manter-se como exportador e expandir a competitividade no mercado. (BRASIL, 2006)

A presença da brucelose no rebanho brasileiro, tanto de corte como de leite, ainda é muito alta, causando grandes prejuízos aos sistemas de produção. As distintas condições geográficas, econômicas e sociais encontradas no país indicam a existência de níveis também variados de sistemas de criações, com fortes contrastes nas situações epidemiológicas de uma região para outra (POESTER; SAMARTINO; SANTOS, 2013). Estas características, somadas ao índice de desenvolvimento humano de determinadas regiões, o qual exerce influência na forma de controle desta doença, geram diferenças nas prevalências entre as regiões (BRASIL, 2006).

Um estudo realizado pela IAGRO, nos anos de 2003 e 2004 em 22 municípios, avaliou a prevalência da brucelose bovina e os fatores de risco associados a esta infecção em 210 propriedades, das quais foram coletadas 2.376 amostras de sangue de fêmeas bovinas, com idade igual ou superior a 24 meses de idade. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a brucelose é prevalente nas propriedades estudadas com 5,6% de animais soropositivos e que o tipo de controle da doença deve consistir especial atenção à exploração do tipo corte, à raça zebuína e à presença de aborto (MONTEIRO, 2004). A prevalência desta doença no rebanho nacional gera barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos diretos e indiretos, pois se trata de uma doença de extrema importância na área veterinária e para a saúde pública. Em 2009, foi realizado um estudo epidemiológico e relataram que no Mato Grosso do Sul, pelo menos um animal foi reagente à prova sorológica, chegando a ser da ordem de 41,5% (CHATE et al., 2009).

A prevalência desta doença no rebanho nacional gera barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos diretos e indiretos, pois se trata de uma doença de extrema importância na área veterinária e para a saúde

pública.

3.5 Diagnóstico

O método mais confiável e inequívoco para o diagnóstico de doenças determinadas por bactérias é o isolamento e a identificação do agente etiológico. Os métodos de diagnóstico para a detecção da brucelose são baseados em aspectos clínicos, nos dados epidemiológicos e nos métodos laboratoriais, pela identificação do agente por métodos diretos, com isolamento e cultura do agente; pela detecção do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por métodos indiretos pela detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. (ACHA; SZYFRES, 1986; BRASIL, 2006; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

3.5.1 Diagnóstico sorológico empregados na detecção de anticorpo anti-*Brucella*.

Os métodos indiretos são utilizados como testes de triagens, baseados na presença de anticorpos nos soros e nos fluídos corporais. Os primeiros testes sorológicos descritos na detecção de anticorpos contra *B. canis* foi o de aglutinação em tubo (MOORE; BENNETT, 1967) para aglutinação rápida em placa utilizando o 2- mercaptoetanol (2ME), e o teste de aglutinação melhorado por CARMICHAEL e JOUBERT (1988) com o emprego de uma amostra não mucóide (M-) de *B. canis* na produção do antígeno.

O diagnóstico da brucelose canina é bastante difícil devido à flutuação de títulos de anticorpos séricos e aos diferentes métodos usados para detectá-los (WANKE, 2004). Alguns testes sorológicos apresentam o inconveniente de erros na interpretação, em decorrência da reatividade cruzada com outros microrganismos.

Como consequência da inacurácia dos testes sorológicos, a cultura é o método definitivo para confirmação do diagnóstico. Entretanto, cães cronicamente infectados podem apresentar resultados falso-negativos no teste (JOHNSON; WALKER, 1992). Assim como nos estudos da brucelose bovina, os testes mais utilizados para detecção de anticorpos contra antígenos de superfície de *B. canis* são os testes de soroaglutinação rápida (SAR) e soroaglutinação lenta em tubo (SAL) (JOHNSON; WALKER, 1992). Ambos são testes sensíveis e detectam animais recentemente infectados, sendo indicados para procedimentos de triagem

(JOHNSON; WALKER, 1992). Sendo que, o SAR que tem como antígeno *B. ovis* corados com o corante rosa de bengala é o teste sorológico mais comumente utilizado na triagem das infecções por *B. canis*. Caracteriza-se por ser de fácil execução, rápido e principalmente barato, além de poder ser utilizado em clínica veterinária.

Uma das vantagens do SAR é a detecção precoce de anticorpos a partir de três a quatro semanas após a infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1998). Entretanto, pode ocorrer uma proporção significativa de resultados falso-positivos (GEORGE; CARMICHAEL, 1978). Apresentando uma alta sensibilidade, porém baixa especificidade, para diminuir o número de reações falso-positivas, alguns testes incluíram o tratamento prévio dos soros com 0,2M de 2-mercaptoetanol (2ME) que elimina a interferência de IgM não específica, aumentando a especificidade sem alterar a sensibilidade do teste. Pelo fato de serem decavalentes, as moléculas de IgM, possuem maior avidéz que a moléculas de IgG, que são bivalentes (MINHARRO et al., 2005).

O 2ME desnatura a IgM pela destruição das pontes dissulfídicas, minimizando as ligações inespecíficas. (FERRI et al., 1977; TIMONEY et al., 1988). Outra tentativa para diminuir as reações falso-positivas foi a utilização de uma amostra não mucóide de *B. canis* (M-) na preparação do antígeno, associada ao tratamento prévio dos soros pelo 2ME. Isso levou à diminuição de resultados falso-positivos para menos de 10% sem perda da sensibilidade da SAR – 2ME (DAMP et al., 1973).

A SAL é o teste sorológico clássico para o diagnóstico da brucelose canina. Fornecem os resultados em título (semiquantitativo) e muitas vezes utilizado para a confirmação da SAR-2ME (CARMICHAEL; GREENE, 1998). Outro teste sorológico empregado para o diagnóstico da brucelose por *B. canis* é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Existe dois métodos de IDGA: o que utiliza antígenos de parede celular (IDGA – LPS – *B. canis* e *B. ovis*) e o que utiliza antígenos de proteínas citoplasmáticas (IDGA – PC – *B. canis*) (CARMICHAEL, 1990). O IDGA – LPS não é tão facilmente utilizável quanto a SAR ou a SAL, pois a preparação do antígeno e a leitura dos resultados são mais complexos. Embora seja mais específico do que a SAR – 2ME, reações cruzadas com outros microrganismos ainda podem ocorrer. O teste de imunodifusão utilizando antígeno citoplasmático (IDGA – PC), atualmente, é

o método mais específico para a detecção de *Brucella* spp rugosas.

O IDGA – *B. canis* utilizado em paralelo com o IDGA – *B. ovis* aumenta a eficácia e a confiabilidade do diagnóstico sorológico da brucelose canina, podendo ser recomendado como teste confirmatório para o diagnóstico da enfermidade (MARASSI et al., 2004). Azevedo et al. (2004), sugerem que a concordância regular da fixação do complemento comparada a IDGA-ME, sugere a sua utilização para o diagnóstico sorológico da brucelose canina por *B. canis*. No entanto, estudos futuros de validação utilizando como teste padrão um método direto são necessários, visto que esta técnica ainda não é padronizada para o diagnóstico da brucelose canina por *B. canis* no Brasil.

Antígeno acidificado tamponado (AAT) é preconizado pelo PNCEBT e OIE como teste padrão para triagem de *B. abortus*. O teste é preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É o teste de triagem do rebanho. A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. Nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, enquanto que, nessa prova reagem somente os isotipos da classe IgG1. O pH acidificado da mistura soro-antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos. (BRASIL, 2006).

Já os métodos diretos como isolamento e cultura do agente trazem grandes riscos de infecção para o executor, pois este microrganismo pode se dispersar pelo ar e ser inalado, desta forma, se faz necessário a utilização de equipamento adequados de proteção (NEWBY et al., 2003; PROBERT et al., 2004). O diagnóstico da infecção por *B. canis* é normalmente realizado por isolamento do patógeno no sangue, sêmen, secreções vaginais, urina e tecidos linfóides (GREENE; CARMICHAEL, 2005). No entanto, o cultivo é demorado e fastidioso, como todos os

membros do gênero *Brucella* que não crescem facilmente em meio de cultivo, e a cultura negativa não exclui ausência do patógeno.

Atualmente, existem outros métodos para detecção da infecção por *Brucella* em cães, um destes é o ensaio de imunocromatografia, que é um teste rápido e consiste na detecção qualitativa de anticorpos anti *Brucella* em amostras de soro ou plasma de cães (KIM et al., 2007). No Brasil existe o teste comercial Brucelose Ab Teste (Eco Diagnóstica®); este teste apresenta alta especificidade (100%) e sensibilidade (95%). Entretanto, podem ocorrer resultados falsos positivos ou negativos, desta forma não é aconselhado para ser utilizado como teste de triagem e sim como um teste após utilização do teste AAT (WANKE et al., 2012).

Em relação à detecção de *Brucella* em outras espécies de animais como nos bovinos vários testes são aplicados e estudos são realizados no intuito de buscar melhor técnica de controle e erradicação da brucelose (BRASIL, 2006).

Diversos países que erradicaram ou estão em fase de erradicação da brucelose, estão utilizando o teste de fixação de complemento (FC), pois é o teste de referência para o trânsito internacional de animais recomendado pela OIE. Apesar do FC detectar tanto IgG1 quanto IgM, o IgG1 é mais efetivo como fixador de complemento; os animais infectados permanecem positivos por longos períodos e os títulos de anticorpos fixadores de complemento permanecem mais elevados do que nas provas de aglutinação. Nos animais vacinados, acima de 8 meses esses anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rápido do que os de aglutinação (BRASIL, 2006; POESTER, 2010; CHOTHE; SAXENA, 2014).

A prova de ELISA (indireta e competitiva) permite o processamento de um grande número de amostras simultaneamente e quando há hemólise na amostra, não afeta a viabilidade do soro (NOZAKI, 2004)

No I-ELISA, emprega-se como antígeno o LPS de *B. abortus* e como conjugado utiliza-se anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado a peroxidase, utiliza-se agentes quelantes como EDTA/EGTA para minimizar reações inespecíficas. O teste é de alta sensibilidade e especificidade semelhante a do AAT (CHOTHE; SAXENA, 2014). No teste de C-Elisa, também é utilizado como antígeno imobilizado na fase sólida o LPS de *B. abortus*. O soro é misturado com anticorpo

monoclonal específico contra a cadeia “O” de *B. abortus*. Para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida do teste, utiliza-se um conjugado de peroxidase-anti-IgG. Quanto maior a quantidade anti-cadeia “O” de *Brucella* spp. no soro testado, maior será a competição com o anticorpo monoclonal. O teste é muito sensível e específico e recomendado pela OIE como teste confirmatório para o diagnóstico assim como a fixação de complemento (FC) (BRASIL, 2006; CHOTHE; SAXENA, 2014).

Teste de polarização de fluorescência (FPA) utiliza como antígeno o polissacarídeo “O” de *B. abortus*. A prova compara velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução, que é o principal fator influente na velocidade de rotação da molécula, sendo inversamente proporcional a ela. Haverá formação dos complexos anticorpo-antígeno conjugado quando houver anticorpos no soro e a velocidade de rotação será inferior a do antígeno-conjugado isolado e com o auxílio do equipamento de iluminação por luz polarizada determina-se a velocidade de rotação das moléculas. O teste é utilizado em soro e leite e é concluído em poucos minutos, vem sendo utilizado em bovinos e existe intenção de que seja inserido no PNCEBT (BRASIL, 2006)

3.5.2 Diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase

O método de reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método de detecção de DNA de patógenos. Este tem sido amplamente aplicado pela rapidez, sensibilidade e alta especificidade da técnica em detectar DNA, pois não depende da viabilidade da bactéria (KEID et al., 2007a; HINIC, 2008; OLIVEIRA et al., 2010). Nesta reação utiliza-se *primers* alvos de regiões que identificam o gênero e espécies de *Brucella* (VEMULAPALLI et al., 1999; MORENO et al., 2002; HINIC, 2008).

Vários ensaios de PCR têm sido desenvolvidos para diferenciação das espécies e biovars de *Brucella*, baseado no tamanho dos fragmentos amplificados (BRICKER; HALLING, 1994) associados às análises do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) (DA COSTA, 1996) e do polimorfismo por amplificação randômica (RAPD) (SREEVATSAN et al., 2000).

As regiões alvos utilizadas codificam proteínas externas de membrana (*omp 2b*, *omp2a*, *omp31* e *bcsp 31*) (BAILY et al., 1992; GUARINO et al., 2000), 16S *rRNA* (HERMAN; RIDDER, 1992), 16S-23S região inter-gênica ITS (DA COSTA, 1996), gene ligado ao metabolismo do eritritol (BRICKER; HALLING, 1994) e sequências de interseções IS711 (IS313/IS639), (BRICKER; HALLING, 1994; REDKAR et al., 2001).

Os *primers* B4/B5 foram utilizados para amplificar uma sequência de 223 pares de base (pb) do gene que codifica a proteína periplasmática imunogênica BCSP31 específica de *Brucella* spp. (FERNANDES, 2011). Estes têm sido amplamente utilizados na detecção do gênero *Brucella* por ser conservado em todas as espécies. A PCR realizada utilizando estes *primers* B4/B5 foram testadas em culturas puras de *B. melitensis*, *B. abortus* e outras bactérias gram-negativas. A sensibilidade analítica observada foi de 20 bactérias/mL de suspensão bacteriana analisada, não tendo sido observadas reações cruzadas com os outros microrganismos utilizados. Entretanto, verificou-se que os *primers* B4/B5 também amplificam DNA de *Ochrobactrum anthropi*, uma bactéria cuja infecção associada em seres humanos ocorre com baixa frequência (CASANAS et al., 2001).

Outro alvo utilizado para detecção de bactérias do gênero *Brucella* e o elemento de inserção múltipla IS711, que se baseia nas repetições *in tandem* no elemento de inserção 711 (IS711), que é uma região exclusiva de *Brucella* spp. que pode variar em número de cópias de acordo com as diferentes espécies e biovars (BRICKER; HALLING, 1994; VEMULAPALLI et al., 1999; MORENO et al., 2002). Significativos esforços têm sido realizados no desenvolvimento do diagnóstico da brucelose pelas técnicas moleculares.

Os *primers* B4 e B5 foram utilizados por Keid 2001, que propôs uma PCR para detecção de DNA de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados. Porém, mesmo após inúmeras alterações na reação de PCR a autora descreve que não foi possível a detecção de DNA de *Brucella* spp. em sangue total de cães naturalmente infectados, descrevendo que em muitos casos foi observado múltiplos fragmentos gerados na PCR, tornando impossível a visualização de um fragmento único, referente ao esperado de 223 pares de bases, correspondente ao gene que codifica uma proteína de 31kDa.

O par de *primers* BMEII0987 para gênero codifica uma proteína agrupada em uma região de 21kDa no cromossomo II com gene *flyG* que amplifica 152 pb, as transposases com significativa semelhança para ORF no plasmídeo de *Rhizobium*, a região de 2,2 kb no cromossomo II que contém ORFs que estão envolvidas na desnitrificação e incluem um regulador da transcrição do CRP (RAJASHEKARA, 2004; HINIC, 2008).

Os *primers* BruAb2_0168 que amplificam 81pb corresponde ao gene para *B. abortus* e codifica a proteína de membrana *omp31* que foram escolhidas dentro de regiões dentro as ORFs *omp31* que servem para a construção de iniciadores e *primers* para espécie (HINIC, 2008).

Estes ensaios têm sido aplicados para a detecção de DNA bacteriano e identificação das espécies, com uma amplitude de 10 a 100 fg de DNA genômico, equivalente a 10 a 7000 células por mL de sangue (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; GUARINO et al., 2000; LEAL-KLEVEZAS et al., 2000) ou leite (RIJPENS et al., 1996; ROMERO; LOPEZ-GONI, 1999; SREEVATSAN et al., 2000). Ensaios por PCR convencional utilizando um par de *primer* ou vários pares (PCR-Multiplex) ou até mesmo um coquetel de *primers* permitem a detecção de mais de uma espécie ou biovars de *Brucella* (BRICKER; HALLING, 1994; SREEVATSAN et al., 2000).

A maioria dos métodos de PCR foi desenvolvida utilizando DNA de *Brucella* preparado diretamente a partir de bactérias cultivadas ou extraído a partir da cultura. A qualidade e a pureza do DNA de *Brucella* spp. é muito importante na realização destes métodos, especialmente para os de PCR multiplex. Qualquer inibidor nas amostras de DNA, de quaisquer fontes, pode limitar a utilização destes métodos. Reações falso-negativas podem ocorrer através de um número de mecanismos, tais como amostras que contém EDTA ou RNase DNase, heme, heparina, fenol, poliaminas, polissacarídeos vegetais, urina, alginato de cálcio e, provavelmente, uma série de outros reagentes. Reações falso-positivas resultantes a partir de contaminação de amostras ou amplicon transição também requerem atenção (SREEVATSAN et al., 2000).

3.5.3 Vacinação

No Brasil, as vacinas utilizadas são as recomendadas pela Organização Mundial de Epizootias (OIE) nos programas de controle da brucelose são as vacinas atenuadas B19 e RB51.

Todo o processo de imunização está preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), que adotou no ano de 2001 a vacina B19 contra brucelose bovina para a vacinação em massa de novilhas entre três e oito meses de idade.

No ano de 2007 foi aprovada a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº 13 (28/08/2007), que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007).

A cepa vacinal B19 é a linhagem atenuada comumente utilizada na prevenção da brucelose bovina e é amplamente utilizada em campanhas de erradicação no mundo todo. No entanto, a B19 apresenta três grandes desvantagens: i- é virulenta para o homem; ii- induz aborto quando administrada em fêmeas gestantes; iii- a presença do seu LPS liso interfere com a discriminação entre os animais infectados e os vacinados durante os procedimentos de triagem imunológica (BRASIL, 2006). Esta cepa tornou-se atenuada devido às mutações espontâneas, sendo uma delas a deleção de 702 pb no gene do *ery*, o que a torna incapaz de metabolizar o eritritol. Entretanto, em algumas situações tem a capacidade de causar aborto em bovinos. As espécies pertencentes ao gênero *Brucella* utilizam preferencialmente a via metabólica do eritritol, promovendo o crescimento em meios ricos em eritritol (SANGARI et al., 2000).

A amostra vacinal RB51 está sendo utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19, como uma vacina para prevenção da brucelose e abortos em bovinos, pois os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto quando foram experimentalmente infectados com a amostra virulenta S2308 de *B. abortus* (SCHURIG, 1991; CHEVILLE *et al.*, 1996). Entretanto, Yazdi e colaboradores (2009) descreveram casos de aborto em vacas de uma fazenda no Irã após a vacinação com a amostra vacinal RB51.

A vacina RB51 quando utilizada em dose única, produz um efeito protetor em bovinos similar à amostra B19, com a vantagem de ser menos patogênica para os

seres humanos e poder ser diferenciada de isolados de campo. Porém, esta amostra tem a desvantagem de ser resistente à rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1997).

O elemento de inserção, denominado IS711, é um fragmento de 842 pb delimitado por repetições imperfeitas de 20 pb que interrompe a síntese da cadeia O, quando inserido no gene *wboA*, o qual está envolvido na síntese da cadeia-O de *Brucella* spp. (VEMULAPALLI et al., 1999). Este elemento está presente em cinco ou mais cópias no genoma de *Brucella* spp., sendo estável em número e posição no cromossomo (BRICKER; HALLING, 1994). Entretanto, diferenças no número de elementos foram relatadas, como o biovar 1 de *B. abortus* que possui sete cópias (OUAHRANI et al., 1993).

A vacinação é de responsabilidade do médico veterinário, que deve estar cadastrado no serviço oficial e no Mato Grosso do Sul a agência responsável é a IAGRO.

Até o momento não existe uma vacina contra a brucelose canina, entretanto vários estudos estão sendo desenvolvidos no intuito do desenvolvimento de vacinas. Uma destas vacinas candidatas são as DNA recombinante baseada no gene BLSOmp31 (CLAUSSE et al., 2013) e da proteína recombinante baseada no gene VirB7 e VirB9 (POLLAK et al. 2015) sendo estas vacinas capazes de induzir uma resposta imune protetora.

Para os cães as tentativas terapêuticas em brucelose canina são questionáveis em função da localização intracelular do microrganismo (MEGID et al., 2000). Os antibióticos convencionais não são capazes de combater a bactéria adequadamente, o que requer a utilização de antibióticos com boa permeabilidade.

5. REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed., Washington, Ed. Organización Panamericana de la Salud, 1986.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: **Institut National de la Recherche Agronomique**. 1988. 545p.
- AKRITIDIS, N.; TZIVRAS, M.; DELLADETSIMA, I.; STEFANAKI, S.; MOUTSOPOULOS, H. M.; PAPPAS, G. The liver in brucellosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 2007, n. 5, p. 1109–1112, 2007.
- AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I. J. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 499-500, 2003.
- BAEK, B. K.; LIM, W. L.; RAHMAN, S.; KIM, C-H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 67, n. 4, p. 312–314, 2003.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. **Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification.**The **Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1992, n. 95, p. 271-275.
- BANG, B. Die Aetiologie des Seuchenhaften (Infectiosen) Verwerfens. In POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 32. n. 1, p. 105-115, 2013.

BARR, S.C.; EILTS, B.E.; ROY, A.F., MILLER, R. 1986. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 686–687, 1986.

BEZERRA, R. A.; MENDONÇA, C. E. D.; SICUPIRA, P.M.L.; MUNHOZ, A.D.; RIBEIRO, A. R. P.; CARLOS, R.S.A.; RÊGO, G. Prevalência de anticorpos contra *Brucella canis* em cães na região de Ilhéus-Itabuna, estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.34, n.1, p.27-30, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boletim da Defesa Sanitária Animal. v. 30, n. 3, p. 39-50, 2000.

BRASIL. Instrução Normativa DAS. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. v. 32, n. 4, 2006.

BRASIL. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina viva não indutora de formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 (PNCEBT). Instrução Normativa Nº33 de 24 de Agosto de 2007, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. Diário Oficial da União, Brasília, DF. v. 1, n. 6, 2007.

B RICKER, B. J.; HALLING, S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*. v. 32, n. 11, p. 2660–2666, 1994.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever, 1887. In POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 105–115, 2013.

CAMPERO C. M. Brucelosis en toros: una revisión. **Revista de Medicina Veterinária**, v.74, p.8-14, 1993.

CARMICHAEL, L. E. Abortion in 200 beagles (New Report). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.149, n. 15, p. 1126, 1966.

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.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: Greene, C. E. (ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p. 248-257, 1998.

CASANAS, M. C. et al... Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases**, v. 10, p. 127-131, 2001.

CASTRILLÓN-SALAZAR, L.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.A.; SANCHEZ-JIMENEZ, M.M.; OLIVEIRA-ANGEL, M. Factores asociados con la seropositividad a *Brucella canis* en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia , Colombia Factors associated with *Brucella canis* seropositivity in kennels of two regions of Antioquia , Colombia Fatores associados à soropositi. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 10, p. 1975–1987, 2013.

CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiological situation of bovine brucellosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n. 1, p.46-55, 2009.

CHEVILLE, N.F.; STEVENS, M.G.; JENSEN, A.E.; TATUM, F.M.; HALLING, S.M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. **Am. Journal of Veterinary Research**. v. 54, p. 1591-1597, 1993.

CHOTHE, S. K.; SAXENA, H. M. Innovative modifications to Rose Bengal plate test enhance its specificity, sensitivity and predictive value in the diagnosis of brucellosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 97, n. 1, p. 25–28, 2014.

CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; GHERSI, G.; ZYLBERMAN, V.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; GOLDBAUM, F.A.; ESTEIN, S.M. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6129–6135, 2013.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Edited by KRIEG, N. R. and HOLT, J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, p. 377–388, 1984.

CORBEL, M. J. Brucellosis: An Overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 213–221, 1997.

CRAWFORD, R.P.; RUBER, J. D.; ADAMS, B.S. "Epidemiology and "surveillance," In Animal Brucellosis eds K. Nielsen, J.R. Duncan (**Boca Raton, FL: CRC Press**), p.131-151, 1990.

DA COSTA, M., GUILLOU, J. P., GARIN-BASTUJI, B., THIEBAUD, M., DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 267-275, 1996.

DI, D., CUI, B., WANG, H., ZHAO, H., PIAO, D., TIAN, L., TIAN, G., KANG, J., MAO, X., ZHAN, X., DU, P., ZHU, L., ZHAO, Z., MAO, L., YAO, W., GUAN, P., FAN, W., JIANG, H., 2014. Genetic Polymorphism Characteristics of *Brucella canis* Isolated in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

FERNANDES, A. R. F.; AZEVEDO, S. S.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; GENOVEZ, M. É., 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. 2011, n. 42, 1405-1408, 2011.

FORBES, L.B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal oh the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

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 Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 2007, n. 57, p. 2688–2693, 2007.

FLORES-CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ -PFEIFFER, C.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 591–597, 1977.

GODFROID, J. 2002. Brucellosis in wildlife. **Revolution Science Technology**, v. 21, n. 2, p. 277-286, 2002.

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

HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification on *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 2099-2101, 1992.

HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIC, Ž.; MAKAYA, P. V.; FREY, J.; ABRIL, C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. **Journal of Microbiological Methods**. v. 75, n. 2008, p. 375–378, 2008.

HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, n. 2006, p. 575–587, 2006.

HOLST, H. R.; ELTHOLTH, M. M.; HEGAZY, Y. M.; EL-TRAS, W. F.; TAYE, A. A., GUITIAN, J. *Brucella* spp. infection in large ruminants in an endemic area of Egypt: cross-sectional study investigating seroprevalence, risk factors and livestock owner's knowledge, attitudes and practices (KAPs). **BMC Public Health**, v. 11, n. 341, p. 1-10, 2011.

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.

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.

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

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

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico de 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, SP, Brasil), 2006.

KEID, L.B. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary Research Communication**, v. 31, n. 8, p. 951-965, 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, n. 7, p. 1203–1210, 2007b.

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.

KIM, J. W.; LEE, Y. J.; HAN, M. Y.; BAE, D. H.; JUNG, S. C.; OH, J. S.; HÁ, G. W.; CHO, B. K. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of

Brucella canis. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 69, n. 11, p. 1103–1107, 2007.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUES, I. O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUES, I. O.; GARCIA-CANTÚ, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75 n. 1, p. 91-97, 2000.

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

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A. J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; MEIRELLES, C.E.; MORETTI, D.M. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 2010, n. 4, p. 119-126, 2010.

MIRANDA, K. L.; COTTORELLO, A. C. P.; POESTER, F. P., LAGE, A. P. Brucelose canina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 47, 66-82, 2005.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain

by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2007.

MONTEIRO, L. A. R. C.; PELLEGRIN, A. O.; ISHIKAWA, M. M., OSORIO, A. L. A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.217-222, 2004.

MORAES, C. C. G. J.; MEGID, L. C.; SOUZA, A. J. C. Prevalência Da Brucelose Canina Na Microrregião. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 31- 38, 2002.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. **Frontiers Microbiology**, v. 5, n. 213, p. 1-18, 2014.

NEWBY, D. T.; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-3'-exonuclease and hybridisation probe assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4753- 4759, 2003.

NICOLETTI, P.L. Relation ship between animal and human disease. In: Young E.J., Corbel M.J. (Eds). *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. **CRC Press Inc.**, Boca Raton, Florida, 41-51, 1989.

NOZAKI, C. N.; MEGID, K. C.; SILVA JUNIOR, F. F.; VELOSO, C. S. Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA no diagnóstico de brucelose ovina em cabanhas da região Centro-Oeste no estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-5, 2004.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucellosis bovina. In: *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres*, Cap. 2.4.3., 1-39, 2012.

OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1, 417-424, 2002.

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 IS6501copies. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 3265–3273, 1993.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: situação brasileira, Jaboticabal**: FUNEP, 2003, 154p.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2013.

POLLAK, C. N.; WANKE, M. M.; ESTEIN, S. M.; DELPINO, M. V.; MONACHESI, N. E.; COMERCIO, E. A.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Immunization with *Brucella* VirB Proteins Reduces Organ Colonization in Mice through a Th1-Type Immune Response and Elicits a Similar Immune Response in Dogs. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 22, n. 3, p. 274–281, 2015.

PROBERT, W. S.; SCHRADER, K. N.; KHUING, N. Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3 p. 1290-1293, 2004.

RAJASHEKARA, G.; GLASNER, J.D.; GLOVER, D.A.; SPLITTER, G.A. Comparative wholegenome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 15, p. 5040–5051, 2004.

REDKAR, R., ROSE, S., BRICKER, B., DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. **Molecular Cell Probes**, v. 15, n. 1, p. 43-52, 2001.

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

ROXO, E.; PINHEIRO, S.R.; BRANDÃO, M.M.; AGUIAR, J.A.C.; GOUVÊA, G.; PIORUM, 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. **Boletim Informativo de Controle de Zoonoses Urbanas**, v. 13, n. 1, p. 47-49, 1990.

SCHOLZ, H. C. et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **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.; KÄMPFER, 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. **International Journal System Evolutionary Microbiology**. v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.

SCHURIG, G.G.; ROOP, R. M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 171-188, 1991.

SEXTON, J.; VOGEL, J. P. Type IVB-secretion by intracellular pathogens. **Traffic**. v. 3, n. 3, p. 178-185, 2002.

SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F.; PERUMAALLA, V. S.; FICHT, T. A. L.; ADAMS, G.; HAGIUS, S. D.; ELZER, P. H.; BRICKER, B. J.; KUMAR, G. K.; RAJASEKHAR, M.; ISLOOR, S.; BARATHUR, R. R. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7. p. 2602-2610, 2000.

TRUONG, L. Q.; KIM, J. T.; YOON, B.; HER, M.; JUNG, S. C.; HAHN, T. W. Epidemiological Survey for *Brucella* in Wildlife and Stray Dogs, a Cats and Rodents Captured on Farms. **Published online in J-STAGE 9**, August, South Korea, 2011.

VEMULAPALLI, R.; MCQUISTON, J. R.; SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S. M.; BOYLE, S. M. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish

strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 6, n. 5, p. 760-764, 1999.

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

VIZCAÍNO, N.; KITTELBERGER, R.; CLOECKARERT, A.; MARÍN, C.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. Minor nucleotide substitutions in the Omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 7020–7028, 2001.

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

WANKE, M. M.; CAIRO, F.; ROSSANO, M.; LAIN, M., BALDI, P. C.; MONACHESI, N.E.; COMERCIO, E. A.; VIVOT, M. M. Preliminary Study of a Immunochromatography Test for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 370–372, 2012.

CAPÍTULO 1

Frequência de anticorpos anti *Brucella canis* e *Brucella abortus* em cães da região do Pantanal Sul Matogrossense

Ana Laura Bello de Oliveira¹, Andreza G.L. Alves¹, João Bosco Campos Vilela¹, Cristiano Marcelo Espinola Carvalho², Carina Elisei de Oliveira²

¹Mestrandos do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

²Docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

*Endereço de email: carinaelisei@yahoo.com.br

Resumo. A brucelose é uma zoonose infecto-contagiosa, de ampla distribuição geográfica, ocasionada por bactérias coco-bacilos, gram-negativas pertencentes ao gênero *Brucella*. Os animais quando infectados estão sujeitos a problemas reprodutivos, tais como: abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade. Objetivou-se com este estudo detectar a prevalência de anticorpos contra *Brucella* spp. em cães de 18 propriedades rurais da região do Pantanal Sul Matogrossense. Para isso, amostras de soro de 147 cães foram analisadas por meio de aglutinação rápida em placa com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para pesquisar cepas lisas (*Brucella abortus*) e 117 amostras de cães para pesquisa de cepas rugosas (*Brucella canis*), foi realizada a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Das amostras analisadas 23 reagiram, resultando em uma soropositividade de 6,83% para (IDGA) e 10,20% soropositivos no teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Os resultados obtidos não demonstraram significância estatística entre a positividade entre sexo e raça, sendo ambos expostos a infecção por brucelose. Entretanto, foi possível detectar a presença de anticorpo anti-*Brucella* spp. em cães da região do Pantanal Sul Matogrossense.

Palavras-chave: Brucelose canina, IDGA, AAT, Zona rural.

Abstract. Brucellosis is an infectious zoonotic disease, widely distributed, caused by gram-negative bacteria belonging to the genus *Brucella*. The infected animals are subject to reproductive disorders, such as abortion, birth broods and low fertility. The objective of this study was to detect the prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in dogs from 18 farms of Pantanal of Mato Grosso do Sul. For this, serum samples from 147 dogs were analyzed by rapid plate agglutination with buffered acidified antigen (BAA) to find smooth strains (*Brucella abortus*), and 117 samples from dogs were submitted to agar gel immunodiffusion (AGID) to find rough strains (*Brucella canis*). Of the total analyzed samples, 23 were seroreagents, being 6.83% in the AGID test and 10.20% in the BAA test. The results showed no statistical significance between seropositivity and gender and race. However, it was possible to detect the presence of anti-brucella antibodies spp. dogs in the Pantanal of Mato Grosso do Sul.

Keywords: Canine brucellosis, IDGA, AAT, Countryside.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose infecto-contagiosa, de ampla distribuição geográfica, ocasionada por bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*, que infectam os animais domésticos, silvestres e seres humanos (NICOLETTI, 1989). De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), a World Health Organization (WHO) e Office international de Epizooties (OIE), a brucelose é uma das mais importantes zoonoses disseminada no mundo (GARCIA-CARRILLO, 1987) e é responsável por perdas econômicas na produção animal em consequência dos distúrbios reprodutivos, principalmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção pecuária, com alta incidência (POESTER et al., 2009).

Atualmente, dez espécies são descritas com base na classificação da interação com hospedeiro, sendo estas: *B. melitensis* (caprinos, bovinos, ovinos, canídeos e humanos), *B. abortus* (bovinos bubalinos, cervídeos, canídeos e humanos), *B. ovis* (ovinos e cervídeos), *B. suis* (suínos, humanos, bovinos, canídeos e murino), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. microti* (roedor *Microtus arvalis*), *B. canis* (canídeos e humanos) (SCHOLZ et al., 2008), *B. ceti* (golfinhos e baleias), *B. pinnipedialis* (focas e leões-marinhos) (FOSTER et al., 2007) e, mais recentemente, *B. inopinata* (humanos) (SCHOLZ et al., 2010).

As bactérias do gênero *Brucella* são divididas em dois grandes grupos morfológicos, de acordo com a composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular, sendo caracterizadas por colônias lisas ou rugosas. Estas características também estão diretamente relacionadas a algumas espécies, e está associada com a virulência de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* que apresentam morfologia do tipo lisa e quando estas apresentam características rugosas ou mucoide, tornam-se menos patogênicas. Entretanto as espécies *B. ovis* e *B. canis* apresentam morfologia de colônia permanentemente do tipo rugosa ou mucoide colonial (BRASIL, 2006).

A brucelose canina é considerada uma zoonose de importância em saúde pública (CARMICHAEL; KENNEY; 1968), causada por *B. canis*. Os canídeos domésticos e silvestres são mais susceptíveis, ocasionando nestes hospedeiros perdas reprodutivas como abortos em fêmeas gestantes e epididimites e orquites em machos (MEGID et al., 2007).

Brucella canis foi descrita pela primeira vez por Carmichael (1966) em Nova Jersey, EUA, em cães da raça Beagle com histórico de abortamento. No Brasil foi relatada pela primeira vez em Minas Gerais (GODOY et al., 1976). Com ampla distribuição geográfica, esta doença já foi relatada em vários países, Japão, França, Estados Unidos da América,

China, entre outros países da América do Sul, do Oriente Médio, África e Ásia (DI et al., 2014).

O diagnóstico da brucelose nos animais e seres humanos baseia-se na cultura bacteriológica, os testes de triagem sorológica de rotina, teste de aglutinação pelo antígeno acidificado tamponado (AAT), teste de aglutinação do soro prova lenta (SAT) e os ensaios de absorção imunoenzimáticos (ELISA). Os antígenos destes testes são derivados de amostras lisas de *Brucella*, como *B. abortus*, utilizados principalmente para o diagnóstico da brucelose bovina. Portanto, este teste não detecta anticorpos contra infecções por *B. canis*, uma vez que esta espécie não possui a cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular completa, formando colônias de fenótipo rugoso, aspecto mucóide (ALTON et al., 1988). Os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da brucelose canina utilizam antígenos preparados com amostras rugosas de *Brucella* spp., *B. canis* ou *B. ovis*, e os testes mais utilizados são: teste de aglutinação (SAR) ou imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

No Brasil, a maioria dos trabalhos está relacionada com a detecção de anticorpos contra *Brucella*. Em estudo realizado por Azevedo et al. (2003) no estado de São Paulo, detectaram 0,84% e 2,2% de cães positivos, utilizando duas provas sorológicas, mercapto etanol e reação de fixação de complemento, respectivamente. No estado do Rio de Janeiro Maia et al. (1999) encontraram 25,7% e na Bahia, detectaram 37% de positividade nos cães estudados. Por Almeida et al., (2001), no estado de Minas Gerais, foi encontrada 4,9%. Aguiar et al. (2005), encontrou 3,6% de animais, positivos no estado de Rondônia, Bezerra et al. (2012) em Ilhéus (BA), 3,2% em Ilhéus e 4,3% em Itabauna animais positivos para anticorpos anti- *B.canis*, Dorneles et al. (2011) detectaram uma prevalência de 44,53% de soropositividade nos cães, em Umuarama (PR), 13,04% de animais positivos.

Os cães também podem se infectar com *B. abortus* e *B. suis*, entretanto, pouco se sabe sobre *B. suis* em canídeos Ramamoorthy et al. (2011); em relação à *B. abortus*, esta espécie pode persistir em descargas vaginais de cães por tempo superior a 42 dias após o parto ou abortamento (BAEK et al., 2003), sendo a descarga vaginal e os restos de abortos dos cães doentes os materiais de maior risco na transmissão do agente para os outros cães e animais de produção. Os cães também podem eliminar *B. abortus* nas fezes e urina, porém este evento é de pouca importância para a disseminação da bactéria, em razão da baixa bacteremia e do curto período de eliminação (FORBES, 1990; MEGID et al., 2007).

O Pantanal Sul Matogrossense apresenta um fluxo intenso de animais domésticos e silvestres, o que pode contribuir para a disseminação do agente *Brucella* spp. Não existe estudos realizados nesta região para investigar *Brucella* sp. Nesse sentido, objetivou-se com

este estudo detectar a frequência de anticorpos contra *Brucella* spp. em cães da região do Pantanal Sul Matogrossense.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras

Foram colhidas 167 amostras de sangue total de cães de 18 propriedades rurais da Sub região Nhecolândia (18° 59' 15'' S; 56° 37' 03''), região central do Pantanal Sul Matogrossense, durante o período de agosto de 2013 a julho de 2014. As colheitas foram realizadas em cães aparentemente saudáveis, de ambos os sexos, com idade e raça variadas. Após assepsia da pata com álcool iodado, foram coletados através de punção da veia radial 3 ml de sangue sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas (2000 xg/15min) e os soros obtidos foram armazenados a -20°C no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, para posterior utilização. Respeitaram-se as normas do Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, na utilização de animais em pesquisa com parecer favorável (protocolo n°. **001/2013**) para a execução do presente trabalho.

O tamanho da amostra foi determinado considerando a prevalência de 10% de animais infectados (baseado no valor de referência bibliográfica da prevalência média reportado da doença em cães) Truong (2011). Assim, o número mínimo de animais, com precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, a ser examinado foi de 167, de acordo com a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

d^2

Onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

Diagnóstico Sorológico

A pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus* e *B. canis* foi realizada no laboratório SINOVA-Biotech de Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande – MS, utilizando-se os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste de Imunodifusão

em Gel de Àgar (IDGA), respectivamente. O antígeno usado no AAT consistiu de uma suspensão celular inativada de *B. abortus*, amostra 1119-3, e o *kit* de IDGA o antígeno foi o lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*, amostra Reo 198, ambos produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR)., As técnicas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As leituras dos resultados foram realizadas, três minutos para o AAT e 24, 48 e 72 horas para IDGA, em sistema de iluminação indireta e fundo escuro. Os resultados de IDGA foram considerados pela leitura final, com 72 horas de incubação das amostras.

Para análise das variáveis estudadas (raça - definida, sem raça definida; sexo - macho e fêmea), foram utilizados testes estatísticos do Odd Ratio para avaliar a dispersão das frequências, utilizando o programa BioEstat. versão 5.0 (Belém, Pará, Brasil).

RESULTADOS

Das 167 amostras de soros de cães colhidas, apenas 117 foram analisadas pela prova de IDGA e 147 pela AAT. Dos 117 soros testados, 6,83% (8/117) (IC 95% = 5,98% – 7,67%) foram positivos para os anticorpos anti - *B. canis*, pelo teste IDGA. Em relação ao teste AAT, constatou-se que em 10,20 % (15/147) (IC 95% = 5,8% – 15,0%) dos cães foram positivos.

A população canina investigada no estudo foi composta por animais de ambos os sexos, e dos 23 animais soropositivos (9/15) eram machos e (6/15) fêmeas no teste AAT; e (3/8) machos e (5/8) fêmeas no teste de IDGA, portanto analisando-se o sexo como possível fator de risco associado a soropositividade para *B. abortus* e *B. canis*, não foi observada diferença estatística ($p=0,9032$) e ($p=0,3993$) respectivamente, ou seja, machos e fêmeas estão expostos ao mesmo risco de infecção na população estudada. Neste estudo também não foi possível associar ($p=0,7301$) a soropositividade de *B. canis* e ou *B. abortus* com a raça, considerado como outro possível fator de risco, (3/15) raça definida e (12/15) sem raça definida no teste do AAT e no teste de IDGA, (4/8) raça definida e (4/8) sem raça definida.

A busca de anticorpos contra os agentes causadores da brucelose canina é relatada por vários autores, que encontraram valores semelhantes à frequência observada neste estudo, corroborando aos dados obtidos por Bezerra, et al. (2012), no Estado da Bahia 3,4% (22/638), Vasconcelos et al. (2008) e Fernandes et al. (2011) no Estado da Paraíba (2,35%), (3,11%) (6/193), respectivamente, Ferreira et al. (2007) no Estado do Rio de Janeiro (2,53%) e Cavalcanti et al. (2006) no Estado da Bahia (5,88%), Aguiar et al., 2005 (3,6%, 11/304). Outros valores de frequência expressivos foram relatados por Keid et al. (2004) no estado de

São Paulo (33,91%), Maia et al. (1999) no Rio de Janeiro (25,70%) e Melo et al. (1998) na Bahia (37,00%); Vargas et al. (1996) (77,2%) e menos expressivos por Reis et al. (2008) e Moraes et al. (2002) ambos no Estado de São Paulo, obtiveram frequências de 0,80% e 0,84%, respectivamente.

A variação da frequência observada na detecção de anticorpos anti-*B. canis* relatados por diversos pesquisadores pode estar correlacionada ao delineamento experimental e ao próprio teste empregado para o diagnóstico. No teste IDGA utiliza-se como antígeno LPS de *B. ovis*, que muitas vezes pode resultar em falso positivo, pois o antígeno de superfície é comum a outras espécies de bactérias, além disso, IDGA é um teste de baixa sensibilidade analítica e pode ocorrer falha na detecção precoce de infecções crônicas (KEID et al., 2004).

Em relação ao teste AAT constatou-se que 10,42 % dos cães foram positivos. Os cães podem ser infectados e desenvolvem sinais clínicos, até mais severos, quando infectados por *B. suis* e *B. abortus* e *Brucella mellitensis* (WOLDEMESKEL, 2013).

As formas de infecções de cães por *B. abortus* e ou *B. suis* é acidental e geralmente resulta do contato estreito de cães com animais domésticos e silvestres infectados, principalmente em áreas rurais (MEGID et al., 2006). Estes animais se infectam por contato ou ingestão de produtos de origem animal, restos placentários ou de fetos abortados infectados (FORBES, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998; AZEVEDO et al., 2003; BAEK et al., 2003; MEGID et al., 2007; CORRENTE et al., 2010). Em relação à raça e sexo não foi observado diferença significativa, apesar da brucelose canina ter sido descrita, principalmente, em animais de raça e fêmeas.

Com este estudo foi possível observar a presença de anticorpos circulantes contra as espécies de *Brucella* dos morfotipos liso e rugoso nos cães avaliados. A área de estudo caracteriza-se por atividade econômica predominante pecuária (ALHO; LACHER, 1991) e a presença de animais domésticos e silvestres pode propiciar a presença do agente infeccioso para estas populações de animais. Desta forma, se faz necessário a adoção de medidas sanitárias para prevenção e controle da brucelose canina nesta região.

Tabela 1. Frequência das amostras reagentes à prova do AAT e IDGA.

VARIÁVEIS	DESCRIÇÃO	ANIMAIS									
		IDGA					ATT				
		+	-	p	OR	IC (95%)	+	-	P	OR	IC (95%)
SEXO	MACHO	3	76	0,1456	3,9731	0,8493-16,9402	9	92	0,7301	0,9032	0,5835-17,908
	FEMEA	5	33				6	40			
RAÇA	RD	4	22	0,3321	0,3692	0,0885-1,5945	3	23	1,1848	0,9130	0,367-18,978
	SRD	4	91				12	109			

Com a realização deste trabalho foi possível detectar anticorpos contra *Brucella* spp. em amostras de soro de cães domésticos da região do Pantanal Sul Matogrossense, utilizando os métodos sorológicos como Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).

REFERÊNCIAS

ALHO, C. J. R.; LACHER, T. E. Mammalian conservation in the Pantanal of Brazil. In: MARES, M.A.; SCHMIDLY, D.J. (eds.). Latin American mammalogy: history, biodiversity and conservation. pp. 280-294. University of Oklahoma Press, Norman, EUA. 1991.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELOS, 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. 2005. 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.; MENESES, A. M.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; LOIOLA, C. F.; MARINOVICK, C.; FERREIRA, P. A. Soroprevalência da brucelose canina na cidade de Alfenas, MG. Dados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.358-360, 2001.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. INRA, Paris., 1988.

AZEVEDO, S. S.; VASCONCELOS, 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.

BAEK, B. K.; LIM, C. W.; RAHMAN, M. S.; KIM, C. H., OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 64, n. 2003, p. 312-314, 2003.

BEZERRA, R. A.; MENDONÇA, C. E. D.; SICUPIRA, P.M.L.; MUNHOZ, A.D.; RIBEIRO, A. R. P.; CARLOS, R.S.A.; RÊGO, G. Prevalência de anticorpos contra *Brucella canis* em cães na região de Ilhéus-Itabuna, estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.1, p.27-30, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. Brasília: MAPA/SDA/DSA.188 p., 2006.

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

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.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: Greene, C. E. (ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders. p. 248-257, 1998.

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 Produção Animal**, v.7, n.2, p. 176-180, 2006.

CARNEIRO, J.; ZAHARIAS, F.; PACHECO, S.T.; MENDONÇA, L. F.W. Investigação da soropositividade para brucelose em rebanhos caprinos produtores de leite para consumo humano. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 6, p. 53-58, 2005.

CARVALHO, M., P.; SOUZA, L.S.; CARVALHO, J.A.; AARAÚJO, B.M. Fatores de risco e soroprevalência da brucelose em assentamento rural no município de Aragominas - TO, **Brasil Cadernos Unifoa**, n. 22, p. 81-93, 2013.

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

DI, D., CUI, B., WANG, H., ZHAO, H., PIAO, D., TIAN, L., TIAN, G., KANG, J., MAO,

X., ZHAN, X., DU, P., ZHU, L., ZHAO, Z., MAO, L., YAO, W., GUAN, P., FAN, W., JIANG, H., 2014. Genetic Polymorphism Characteristics of *Brucella canis* Isolated in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

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

ELISEI, C., PELLEGRIN, A.; TOMAS, W. M.; SOARES, C. O., ARAÚJ, F. R., FUNES-HUACCA, M. E., ROSINHA, G. M. S. Evidência Molecular de *Brucella* sp. em *Ozotocerosbezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 503-509, 2010.

FERNANDES, A.R.F.; FERNANDES, A.G.; ROTONDANO, T.E.F.; ALVES, C.J.; KIM, P.C.P.; MOTA, R.A.; AZEVEDO, S.S. *Brucellacanis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p.1405-1408, 2011.

FERREIRA, T.; MANDELBAUM, M.A.; MARQUE, 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.

FORBES, L.B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal oh the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

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 Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 2007, n. 57, p. 2688–2693, 2007.

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

GODOY, A. M.; PERES, J. N.; BARG, L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. *Arquivo da Escola Superior de Veterinária da UFMG*, v. 1976, n.29, p. 35- 42, 1976.

HIRSH, D. C., ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464p.

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

MAIA, G.R.; ROSSI, C.R.S.; ABRADIA, F. Prevalência da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niteroi- RJ. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n. 3, p.425-427, 1999.

MELO, S. M. B.; AGUIAR, P. H. P.; NASCIMENTO, R. M.; FREIRE, S. M. Avaliação sorológica por imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo – Camaçari – Bahia. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA*, v. 19, n. 1, p. 119-127, 1998.

MIRANDA, K.L.; COTORELLO, A.C.P.; POESTER, F.P; LAGE, A.P. Brucelose canina. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*, n.47, p.66-82, 2005.

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

MORAES, C.C.G., J. MEGID, L.C. SOUZA, A. J. C. Prevalência Da Brucelose Canina Na Microrregião da serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.

NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. In: Young, E.J.; Corbel, M.J. (Eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. **CRC Press, Inc.**, Boca Raton, Flórida, p. 41-51, 1989.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucelosis bovina. In: Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres. Seção 2.3, Cap. 2.3.1, p. 445-476, 2004.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A.P.; RAMAMOORTHY, S.; WOLDEMESKEL, M.; LIGETT, A.; SNIDER, R.; COBB, R.; RAJEEV, S. *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. **Emerging infection disease**, v. 17, n. 12, p. 2386–2387, 2013.

REIS, C. B. M.; HOFFMANN, 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 Veterinary Reserch Animal Science**. v. 45, n. 1, p. 32-34, 2008.

SAMPAIO, F. Existe equity premium puzzle no Brasil? In BONOMO, M. (Ed.). Finanças aplicadas ao Brasil (pp. 87-117). Rio de Janeiro: **Editora FGV**. 2002.

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 de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, 1051-1056, 2012.

SUZUKI, E.Y.; PENHA, G.A.; UEDA, F.S.; SALVARANI, R.S.; ALVES, M.L.; ZAPPA, V. Brucelose canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. n.10, p.1-4, 2008.

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

SCHOLZ, H. C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASSO, H. *Brucella inopinata* sp. nov. isolated from a breast implant infection. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 2010, n. 60, p. 801-808, 2010.

TRUONG, L. Q.; KIM, J. T.; YOON, B.; HER, M.; JUNG, S. C.; HAHN, T. W. Epidemiological Survey for *Brucella* in Wildlife and Stray Dogs, a Cata and Rodents Captured on Farms. **Published online in J-STAGE 9**, August, South Korea, 2011.

VASCONCELLOS, 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.

CAPÍTULO 2

Deteccão e identificação de *Brucella* spp. em cães domésticos da região do Pantanal Sul Matogrossense.

Ana Laura Bello de Oliveira¹, Gabriel Macedo de Carvalho¹, Jhéssyca Leal¹, Heitor Miraglia Herrera², Carina Elisei de Oliveira^{2*}

¹Mestrandos do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

²Docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

*Endereço de email: carinaelisei@yahoo.com.br

Resumo: A brucelose é uma zoonose infecto-contagiosa, de ampla distribuição geográfica, ocasionada por bactérias coco-bacilos, gram-negativas pertencentes ao gênero *Brucella*. Os animais quando infectados estão sujeitos a problemas reprodutivos, tais como: abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade. Objetivou-se com este trabalho, detectar e identificar espécies de *Brucella* que infectam cães em área endêmica para Brucelose. Para isso, foram colhidas amostras de sangue, com anticoagulante, de 168 cães domiciliados na região do Pantanal Sul Matogrossense. As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase (PCR). Das 168 amostras analisadas foi possível detectar 44,64% (73/168) de animais positivos nos *primers* B4/B5, 41,68% (70/168) de animais positivos com os *primers* IS711, que são *primers* para *Brucella* spp. e 10,71% (18/168) de amostras positivas com os *primers* BruAb_0168 para *B. abortus*. Também foram testados *primers* específicos para *B. canis*, entantanto não obteve-se amostras positivas. Com o estudo foi possível detectar a presença de DNA de *Brucella* spp. em amostras de sangue de animais provenientes de área endêmica para brucelose.

PALAVRAS-CHAVE: *Brucella canis*, *Brucella abortus*, PCR, caninos.

Abstract: Brucellosis is an infectious zoonotic disease of wide geographic distribution, caused by bacteria coco-bacilli, gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. When infected, animals are subject to reproductive problems such as: abortion, birth of weak off spring and low fertility. The purpose of this work was to detect and identify *Brucella* species that infect dogs from a endemic area for brucellosis. For this, blood samples were collected, with anticoagulante, from 168 dogs resident in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. Blood samples were subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR). Of the 168 samples analyzed it was possible to detect 44.64% (73/168) of positive animals in primer B4/B5, 41.68% (70/168) of positive animals in primer IS711, both genus-specific, and 10.71% (18/168) of positive samples in the primer BruAb_0168, *B. abortus*-specific. Also wetested specific *primers* for *B. canis*, however there was no positive samples. With this study it was possible to detect the presence of DNA *Brucella* spp. in blood samples of animals from endemic area for brucellosis.

KEYWORDS: *Brucella canis*, *Brucella abortus*, PCR, canine.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acomete o homem e diferentes espécies animais (ALTON et al., 1976). São bactérias intracelulares facultativas que necessitam de um hospedeiro para sua sobrevivência. Existem diferentes espécies de *Brucella*, as quais exibem preferências por hospedeiros e diferem quanto à gravidade da doença causada (HIRSH; ZEE, 2003).

Os cães domésticos e selvagens são infectados por *Brucella canis*, a qual é descrita em um número limitado de animais, sendo os canídeos domésticos e silvestres os mais susceptíveis. Entretanto, os cães podem também ser infectados por *B. abortus*, *B. suis*, e *B. mellitensis*, sendo que *B. abortus* é a mais relatada (MIRANDA et al., 2005; CASTRILLÓN-SALAZAR et al, 2013).

Geralmente, os métodos de diagnóstico para brucelose canina baseiam-se na biotipagem clássica, testes sorológicos e técnicas moleculares (KEID et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010). O sangue total é um material biológico muito usado na detecção de *Brucella* spp. devido ao caráter crônico da doença e o fato de que a bacteremia perdura por tempo prolongado (KANG et al., 2014).

Sobre os métodos de diagnóstico, o isolamento da bactéria tem suas desvantagens pois *Brucella* é um organismo de crescimento lento que requer um período de incubação prolongado e subculturas cegas, isso também pode representar riscos ao laboratorista que trabalha com o microrganismo. Os métodos sorológicos mais utilizados baseiam-se em técnicas de aglutinação e/ou precipitação contra antígenos de *B. ovis* ou *B. canis*, pois estas espécies compartilham antígenos de superfície e são utilizadas para o diagnóstico da brucelose canina (KEID, 2006). Entretanto, estes testes apresentam desvantagens como baixa sensibilidade e especificidade. Existem outros métodos propostos para detecção da infecção no cão, incluindo ensaios de imunocromatografia (KIM et al., 2007a) e método de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Uma variedade de técnicas que utilizam a detecção de DNA têm sido desenvolvidas, como a PCR e suas variações. A PCR é uma alternativa pela rapidez e sensibilidade da técnica em detectar DNA, os primers utilizados são responsáveis pela especificidade dos resultados (KEID et al., 2007), mas apresentam algumas limitações como custos elevados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas 168 amostras (116 machos e 52 fêmeas) de sangue de cães com sexo, idade e raça variados e domiciliados na região do Pantanal, conhecida como Subregião Nhecolândia (18° 59' 15'' S; 56° 37' 03''). As amostras foram processadas para o teste direto da reação em cadeia da polimerase PCR. Foram analisados os 168 animais com a utilização de cinco pares de *primers* para detecção de DNA de *Brucella* spp., *B. abortus* e *B. canis*. Todo o experimento laboratorial foi realizado no laboratório SINOVA-Biotech de Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande – MS. Respeitaram-se as normas do Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco na utilização de animais em pesquisa com parecer favorável (protocolo n°. 001/2013) para a execução do presente trabalho.

Extração de DNA de amostras de sangue total

A extração do DNA das amostras dos cães, foi realizada conforme Elisei et al. (2010). A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram determinados por espectrofotômetro (Biodrop®), sob absorvância de 260 nm e eletroforese.

Reação de amplificação do DNA

Após a extração do DNA genômico foi realizada PCR com *primers* que amplificam a região do gene da β -globina com a finalidade de confirmar a qualidade da preparação do DNA através da amplificação de um fragmento de 118 pb e, após, foi realizada outra técnica de PCR, que foi processada utilizando os *primers* como descrito por García-Yoldi et al. (2006), Hinic et al. (2008) e Baily et al (1992) (Tabela 1).

Como controle positivo das reações da PCR foi utilizado DNA genômico de *B. abortus* S2308 e *B. canis* SG 771; gentilmente cedidos pelas pesquisadoras Dra. Gracia Maria Soares Rosinha e Dra. Lara Borges Keid, respectivamente.

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para realização da técnica PCR.

<i>Primer</i>	Espécie	Sequência (5' – 3')	Amplificon	Região	Referências
<i>BMEII0987f</i> <i>BMEII0987r</i>	<i>Brucella</i> spp.	CGCAGACAGTGACCATCAAA GTATTCAGCCCCCGTTACCT	152 pb	Cromossomo II <i>fgly</i>	García-Yoldi <i>et al.</i> , 2006
<i>BR00953f</i> <i>BR00953r</i>	<i>B. canis</i> , <i>B. suis</i> e <i>B. neotomae</i>	GGAACACTACGCCACCTTGT GATGGAGCAAACGCTGAAG	272 pb	Cromossomo I <i>polA</i>	García-Yoldi <i>et al.</i> , 2006
<i>IS711f</i> <i>IS711r</i>	<i>Brucella</i> spp.	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT	63 pb	<i>is</i>	Hinic <i>et al.</i> , 2008
<i>BuAb2_0168f</i> <i>BruAb2_0168r</i>	<i>B. abortus</i>	GCACACTCACCTTCCACAACAA CCCCGTTCTGCACCAGACT	81 pb	<i>omp 31</i>	Hinic <i>et al.</i> , 2008
B4f B5r	<i>Brucella</i> spp.	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCTTTCAGGTCTG	223 pb	<i>bcs p 31</i>	Baily <i>et al.</i> , 1992

Os produtos obtidos na amplificação foram submetidos à eletroforese a 100V por 40 minutos em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador sob luz ultravioleta foto documentado em equipamento digital interligada ao MultiDoc – It. Digital Imaging System – UVP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível verificar presença de DNA de *Brucella* sp. no sangue periférico de cães residentes em fazendas do Pantanal, que é uma área endêmica para brucelose bovina. Das 168 amostras de sangue coletadas de cães no Pantanal, todas foram processadas e a prevalência amostral com os diferentes *primers* está representada na tabela 2

Tabela 2 *Primers* utilizados, número e percentual de animais positivos.

<i>Primers</i>	Número de animais positivos	Percentual de animais positivos
B Globina	168	(168/168) 100%
BMEII0987	1	(1/168) 0,60%
B4/B5	73	(73/168) 43,45%
IS711	70	(70/168) 41,67%
BruAb2_0168	18	(18/168) 10,71%
BR00953	-	-

Foram avaliados três pares de *primers* gênero específico e dois pares que amplificam as espécies de *B. canis*, *B. suis* e *B. abortus*. Devido ao elevado grau de semelhança genética entre as espécies de *Brucella*, especialmente do ponto de vista genotípico, o gênero *Brucella* é monofilético com similaridade acima de 97% do seu genoma total entre as espécies. Essa similaridade genética tem dificultado o desenvolvimento de uma PCR simples para detectar ou identificar as espécies de *Brucella* e essa dificuldade é maior ainda entre as espécies *B. canis* e *B. suis* (GARCIA-YOLDI et al., 2006; HINIC et al., 2008).

Desta forma, a busca de regiões mais específicas no genoma de *Brucella* é um dos propósitos de vários autores como Hinic *et al.*, (2008), que visam a utilização do elemento de inserção IS711, específico para o gênero *Brucella*. Esse elemento de inserção pode variar entre as espécies em número de repetições e entre os genes que estão localizados no cromossomo II. Além disso, o IS711 pode servir como alvo para identificação de espécies.

O *primer* BMEII0987, utilizado para identificar gênero, revelou a característica de patogenicidade em seres humanos na comparação do genoma para *B. canis*. Ainda, a maioria dos sequenciamentos realizados com estudos de *B. canis* foram idênticos a *B. suis* com exceção de três ORFs (García-Yoldi *et al.*, 2006).

Para a espécie de *B. abortus*, o gene que codifica a proteína omp31 do *primer* BruAb2_0168 foi utilizado e, para identificar *B. canis*, o gene localizado no cromossomo I que codifica a proteína polA do *primer* BR00953.

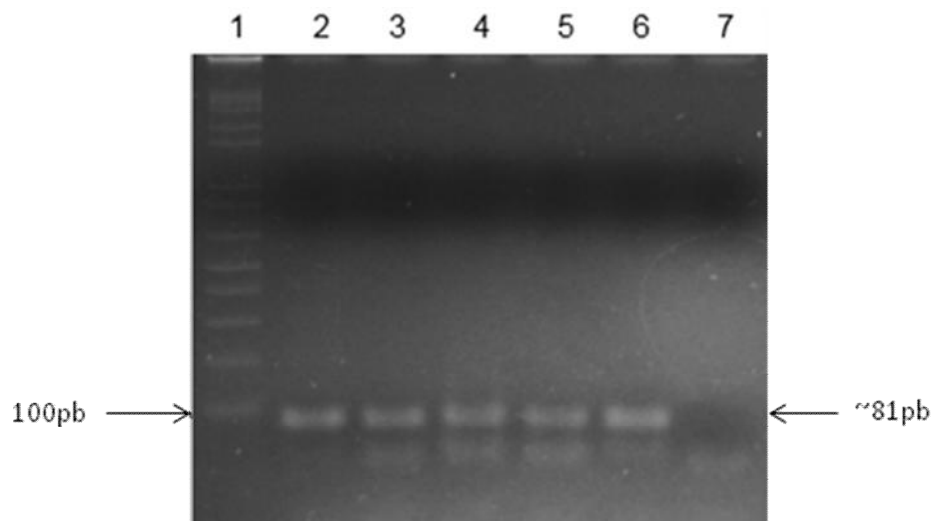


Figura 1. Eletroforese do produto de PCR - Agarose 2%. (1) Marcador molecular 100 pb (Invitrogen®). Com os primers BruAb2_0168, (2-5) amostras positivas de cães para *B. abortus*; (6): Controle positivo; (7): Controle negativo.

Os resultados obtidos com este trabalho corroboram com os dados sobre infecções de *Brucella* spp. em cães, que variam entre 0,84% e 57,1% de prevalência (MORAES et al., 2002; MEGID et al., 1999). Entretanto, essas prevalências podem sofrer alterações de acordo com a população de cães estudada e a técnica de diagnóstico empregada. Estudos sobre a brucelose canina são rescentes, pois é uma doença de baixa prevalência. Portanto, com o aumento da indústria pet e alto valor agregado às raças caninas, alguns surtos de brucelose em cães fez com que este tema se tornasse importante nos últimos anos.

Os primeiros ensaios empregando a PCR para o diagnóstico da brucelose utilizaram *primers* gênero-específico capazes de identificar as bactérias do gênero *Brucella*. Um dos *primers* utilizados foi o B4/B5, que amplifica uma fragmento de 223 pb do gene. Este gene codifica uma proteína periplasmática imunogênica BCSP31 específica em *Brucella* spp. Esse *primer* vem sendo empregado por diversos outros autores com o objetivo de detectar *Brucella* spp. em uma extensa diversidade de substratos de origem biológica, como vísceras, leite e sangue, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (BAILY et al., 1992). Entretanto, em estudos realizados por Keid (2001), que propôs a detecção de DNA de *Brucella* em sangue de cães naturalmente infectados utilizando os *primers* B4 e B5, relatou que não foi possível a detecção e presença de DNA de *Brucella* spp. Em muitos casos, a PCR gerou múltiplos fragmentos, tornando impossível a visualização de um sinal único de um fragmento de 223 pares de bases. Essa observação também foi visualizada neste estudo, entretanto, em alguns animais foi possível visualizar apenas uma banda única de aproximadamente 223 pb correspondente ao esperado.

Das amostras amplificadas com o par de *primers* B4/B5, três produtos que apresentaram melhor concentração (ng/uL) e ausência de bandas inespecíficas foram selecionados e sequenciados. No sequenciamento obtido dos isolados dos cães, apenas 110 pb apresentaram 100% de identidade com gene *bcspr 31* de *B. abortus* (best hits acesso nr [CP008774.1](#) e-value 3e-49).

Entretanto, quando realizado o alinhamento das sequências com outras espécies de *Brucella* (*B. canis* nr acesso CP007629 e *B. suis* nr acesso CP009096) que tem os cães como hospedeiros foi possível observar também uma alta homologia, como mostra a **figura 2**.

```

Animal 09      -GGATACAGC  GTCGCCATAA  GGC GCAAATC  TTCCACCTAA  GCGCTTGCCA
Animal 03      -GGGTAAAGC  GTCGCCAGAA  GGC GCAAATC  TTCCACCT-T  GCCCTTGCCA
Animal 11      -GGGTAAAGC  GTCGCCAGAA  GGC GCAAATC  TTCCACCT-T  GCCCTTGCCA
BSCP31B. canis  CGGGTAAAGC  GTCGCCAGAA  GGC GCAAATC  TTCCACCT-T  GCCCTTGCCA
BSCP31B. suis  CGGGTAAAGC  GTCGCCAGAA  GGC GCAAATC  TTCCACCT-T  GCCCTTGCCA
BSCP31B. abortus -GGGTAAAGC  GTCGCCAGAA  GGC GCAAATC  TTCCACCT-T  GCCCTTGCCA

Animal 09      TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCG-
Animal 03      TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCGT
Animal 11      TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCGT
BSCP31B. canis  TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCGT
BSCP31B. suis  TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCGT
BSCP31B. abortus TCATAAAGGC  CGGTGCCGTT  ATAGGCCCAA  TAGGCAACGT  CTGACTGCGT

Animal 09      AAAGCCGAAC  T
Animal 03      AAAGCCGGAC  T
Animal 11      AAAGCCGGAC  T
BSCP31B. canis  AAAGCCGGAC  T
BSCP31B. suis  AAAGCCGGAC  T
BSCP31B. abortus AAAGCCGGAC  T

```

Figura 2. Alinhamento múltiplo de sequências do gene *bscp 31* de *Brucella*. *Brucella* sp. (isolado de cães - animais 03, 09 e 11) e *B. canis*, *B. abortus* e *B. suis* do GenBank.

Além do alinhamento múltiplo também foi possível realizar a análise filogenética utilizando o programa MEGA 6.0, método de Neighbor-joining, modelo Jukes-Cantor, para verificar a posição dos isolados de cães entre as espécies de *Brucella*. (Figura 3).

Devido ao grau de conservação do gene *bscp 31* e o tamanho do fragmento obtido não foi possível determinar a espécie mais próxima dos isolados dos cães e sim que todos os isolados são pertencentes ao gênero *Brucella*.

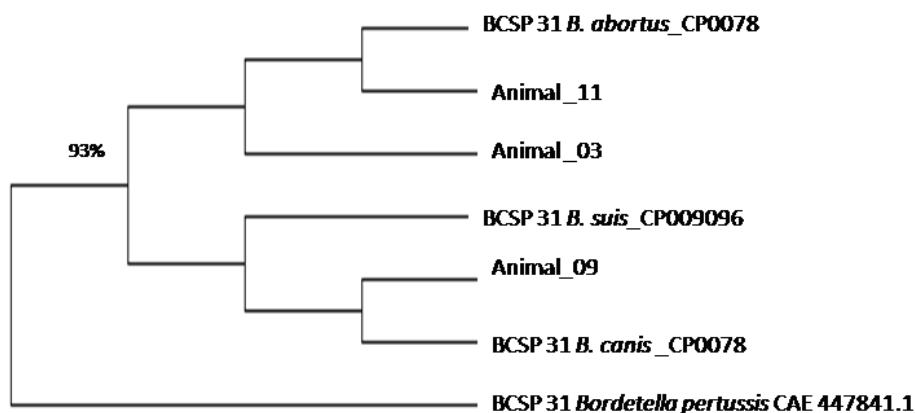


Figura 3. Filogenia de *Brucella* spp. utilizando-se o gene *bcs31*, pelo método de Neighbor-joining, modelo Jukes-Cantor Bootstrap 1000.

Há vários relatos na literatura de cães que co-habitam áreas rurais endêmicas para *B. abortus*. Baek et al. (2003), diagnosticaram por sorologia e PCR cães de área rural que mantinham contato com bovinos também positivos para *B. abortus*, na Coréia do Sul. Em Alfenas-MG, Almeida et al. (2004) relataram a presença de anticorpo anti-*B. abortus* em 2,8% (18/635), em cães da região urbana. No estudo de Aguiar et al. (2005), cães de ambiente rural e urbano do município de Monte Negro, Rondônia, obtiveram uma prevalência baixa de 0,3% (1/304), confirmado pelo teste 2-ME. Em um relato de caso, um cão foi atendido no Centro Veterinário de Bauru – SP com sintomatologia clínica, sendo positivo por sorologia e PCR (MEGID *et al.*, 2007).

A identificação de canídeos infectados é importante, uma vez que esses animais podem servir como fonte de infecção ao eliminar as bactérias no meio ambiente associada às excreções como urina, fezes, secreções vaginais, ejaculados e fetos abortados (FORBES, 1990; BAEK et al., 2003; MEGID et al., 2007). A presença de *B. abortus* em descargas vaginais de cadelas aos 42 dias pós-parto ou abortamento foi relatada por Baek et al., 2003. A descarga e os restos de abortos das cadelas infectadas são considerados fatores de risco na

transmissão do agente entre os cães, os animais de produção e silvestres (FORBES, 1990; BAEK et al., 2003; MEGID et al., 2007).

O contato entre os animais domésticos e silvestres através da utilização de pastagens e fontes de água influencia na dinâmica das doenças infectocontagiosas. Há presença de cães co-habitando com os bovinos em um sistema de produção extensivo, sendo que as pastagens nativas são as principais bases de alimentos para os ruminantes domésticos ou silvestres e a contaminação deste pasto pode ser fonte de infecção para os animais (LACERDA, 2008; SANTOS, 2002).

O Pantanal Sul Matogrossense tem apresentado alta prevalência de focos de brucelose em bovinos (CHATE et al., 2009), portanto, as estratégias de vigilância e controle da doença tornam-se uma tarefa extremamente difícil, devido à riqueza e abundância de espécies de mamíferos que habitam essa região. Com isso o desenvolvimento de programas de controle e vigilância epidemiológica deve contemplar, obrigatoriamente, ambas as espécies de animais domésticas e silvestres (MUMA et al., 2011).

Vale ressaltar que a sazonalidade climática (períodos de cheia e seca) neste ambiente gera *clusters* que proporcionam a transmissão de patógenos devido ao agrupamento de animais em locais secos na época das cheias ou a concentração de animais nos reservatórios de água na seca (CHATE et al., 2009).

O monitoramento da brucelose deve ser feito durante um longo período de tempo em espécies silvestres e domésticas, a fim de caracterizar os fatores que envolvam a transmissão e persistência de *Brucella* spp. nas populações animais do Pantanal Sul Matogrossense e a definição destes hospedeiros. Com a execução deste trabalho foi possível inferir que ocorre a presença de *B. abortus* em amostras de sangue em cães domésticos do Pantanal Sul Matogrossense, utilizando a técnica de PCR.

REFERÊNCIAS

- 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**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1216-1219, 2005.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M.. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: **Institut National de la Recherche Agronomique**. 1988. 545p.
- AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I. J. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 499-500, 2003.
- BAEK, B. K.; LIM, W. L.; RAHMAN, S.; KIM, C-H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 67, n. 4, p. 312–314, 2003.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. **Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification.***The Journal of tropical medicine and hygiene*, v. 1992, n. 95, p. 271-275, 1992.
- BANG, B. Die Aetiologie des Seuchenhaften (Infectiosen) Verwerfens. In POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 32. n. 1, p. 105-115, 2013.
- BARR, S.C.; EILTS, B.E.; ROY, A.F., MILLER, R. 1986. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 686–687.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boletim da Defesa Sanitária Animal. v. 30, n. 3, p. 39-50, 2000.
- BRASIL. Instrução Normativa DAS. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, Legislação Agrícola Federal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. v. 32, n. 4, 2006.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever, 1887. In POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock Pathogenesis of brucellosis infection in cattle. v. 32, n. 1, p. 105–115, 2013.

CARMICHAEL, L. E. Abortion in 200 beagles (New Report). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.149, n. 15, p. 1126, 1966.

CASTRILLÓN-SALAZAR, L.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.A.; SANCHEZ-JIMENEZ, M.M.; OLIVEIRA-ANGEL, M. Factores asociados con la seropositividad a *Brucella canis* en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia , Colombia Factors associated with *Brucella canis* seropositivity in kennels of two regions of Antioquia , Colombia Factores asociados à soropositi. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 10, p. 1975–1987, 2013.

CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA,F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiological situation of bovine brucellosis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.61, n. 1, p.46-55, 2009.

DA COSTA, M., GUILLOU, J. P., GARIN-BASTUJI, B., THIEBAUD, M., DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal Applied Bacteriology*, v. 81, n. 3, p. 267-275, 1996.

DI, D., CUI, B., WANG, H., ZHAO, H., PIAO, D., TIAN, L., TIAN, G., KANG, J., MAO, X., ZHAN, X., DU, P., ZHU, L., ZHAO, Z., MAO, L., YAO, W., GUAN, P., FAN, W., JIANG, H., 2014. Genetic Polymorphism Characteristics of *Brucella canis* Isolated in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

FERNANDES, A. R. F.; AZEVEDO, S. S.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; GENOVEZ, M. É., 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**, 42: 1405-1408, 2011.

FORBES, L.B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal oh the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

GODFROID, J. 2002. Brucellosis in wildlife. **Rev. Science Technology**, v. 21, n. 2, p. 277–286, 2002.

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

HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification on *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 2099-2101, 1992.

HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIC, Ž.; MAKAYA, P. V.; FREY, J.; ABRIL, C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n; 2008, p. 375–378, 2008.

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.

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

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

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, n. 7, p. 1203–1210, 2007.

KIM, J. W.; LEE, Y. J.; HAN, M. Y.; BAE, D. H.; JUNG, S. C.; OH, J. S.; HÁ, G. W.; CHO, B. K. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 69, n. 11, p. 1103–1107, 2007.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUES, I. O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUES, I. O.; GARCIA-CANTÚ, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 91-97, 2000.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A. J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.

MEGID, J.; SALGADO, V. R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; MEIRELLES, C. E.; MORETTI, D. M. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 2010, n. 4, p. 119-126, 2010.

MIRANDA, K.L.; COTTORIELLO, A.C.P.; POESTER, F.P., LAGE, A.P. Brucelose canina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 47, p. 66-82, 2005.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; CAMPOS, F.R.; VIALTA, A.; KEID, L.B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 17-22, Mar. 2007.

MORAES, C.C.G., J. MEGID, L.C. SOUZA, A. J. C. Prevalência Da Brucelose Canina Na Microrregião. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 7–10, 2002.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Brucelosis bovina. In: Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres, Cap. 2.4.3., 1-39, 2012.

OLIVEIRA, S. C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Veterinary Microbiology*. v. 90, n. 1, p. 417-424, 2002.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics.)** v. 32, n. 1, p. 105-115, 2013.

POLLAK, C. N.; WANKE, M. M.; ESTEIN, S. M.; DELPINO, M. V.; MONACHESI, N. E.; COMERCIO, E. A.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Immunization with *Brucella* VirB Proteins Reduces Organ Colonization in Mice through a Th1-Type Immune Response and Elicits a Similar Immune Response in Dogs. *Clin Vaccine Immunol*. v. 22, n. 3, p. 274–281. Published on line 2014 Dec 24. doi: 10.1128/CVI.00653-14, Mar, 2015.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCH, R.; HORNG, T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A.; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SEXTON, J.; VOGEL, J. P. Type IVB-secretion by intracellular pathogens. **Traffic**. v. 3, n. 3, p. 178-185, 2002.

SCHOLZ, H. C. et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 153–156, 2009.

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

WANKE, M. 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho foi possível detectar anticorpos contra *Brucella* spp. em amostras de soro de cães domésticos da região do Pantanal Sul Matogrossense, utilizando os métodos sorológicos como Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).

Foi possível identificar a presença de *B.abortus* em amostras de sangue em cães domésticos do Pantanal Sul Matogrossense, utilizando a técnica de PCR.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Tabela de resultados

Amostra ¹	Quantificação		Bglob ⁴	BMEII ⁵	IS711 ⁶	B4B5 ⁷	BruAb ⁸	BR00953 ⁹
	razão 260/280 ²	Conc. µg/µl ³						
1	0.932	27.47	+			+		
2	1.771	108.0	+			+		
3	1.509	41.50	+	+	+	+	+	
4	1.397	21.13	+			+		
5	0	0	+			+		
6	1.000	0.275	+			+		
7	-2.417	1.415	+			+		
8	1.501	23.97	+			+		
9	1.931	12.44	+		+	+	+	
10	2.043	27.43	+			+		
11	3.645	5.512	+	+		+		
12	1.821	31.05	+	+		+		
13	1.783	145.7	+			+		
14	1.638	95.01	+			+		
15	4.815	18.93	+		+	+	+	
16	1.680	42.01	+			+		
17	0.736	30.60	+	+				
18	3.282	31.64	+			+		
19	-8.262	7.136	+			+		
20	1.440	19.63	+			+		
21	0.405	0.0	+			+		
22	0.803	0.0	+					
23	4.17	78	+		+	+	+	
24	2.64	152	+		+	+	+	
25	11.684	14.22	+			+		
26	4.417	24.56	+			+		
27	3.282	25.89	+			+		

¹ identificação das amostras

² razão entre absorvâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/ml

⁴ resultados da BGlob

⁵ resultados da PCR BMEII0987

⁶ resultados da PCR IS711

⁷ resultados da PCR B4B5

⁸ resultados da PCR BruAb2_0168

⁹ resultados da PCR BR00953

28	3.315	20.05	+			+	
29	11.956	8.730	+			+	
30	2.286	60.44	+				
31	1.092	249.6	+				
32	1.767	119.8	+				
33	1.812	95.98	+				
34			-	+	-	-	-
35	1.668	82.40	+				
36	1.955	34.80	+		+		+
37	2.134	54.58	+				
38	6.524	14.17	+			+	
39	1.990	12.6	+			+	
40	1.998	22.02	+				
41	2.024	71.17	+			+	
42	0.892	0.0	+			+	
43	1.000	0.0	+				
44	16.336	28.76	+				
45	3.279	23.02	+				
46	1.461	60.24	+				
47	1.31	225	+				
48	1.541	59.85	+				
49	2.817	10.85	+			+	
50	2.738	5.127	+			+	
51	1.55	382	+				
52	1.53	109	+			+	
53	1.500	98.94	+			+	
54	1.814	91.39	+			+	
55	1.441	78.40	+			+	
56	1.15	33	+			+	
57	1.39	11	+			+	
58	1.38	31	+			+	
59	1.67	335	+			+	
60	1.64	245	+				
61	0.98	12	+				
62	1.01	47	+			+	
63	1.51	419	+		+	+	
64	0.696	25.24	+		+	+	

¹ identificação das amostras

² razão entre absorvâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/ml

⁴ resultados da BGlob

⁵ resultados da PCR BMEII0987

⁶ resultados da PCR IS711

⁷ resultados da PCR B4B5

⁸ resultados da PCR BruAb2_0168

⁹ resultados da PCR BR00953

65	2.10	112	+		+			
66	1.48	746	+		+			
67	-	-	-	-	-	-	-	-
68	1.28	87	+			+		
69	1.45	39	+			+		
70	1.44	22	+		+	+		
71	1.03	262	+		+		+	
72	1.032	256.2	+					
73	1.113	29.59	+		+	+	+	
74	1.29	41	+		+	+		
75	1.21	43	+			+		
76	1.420	10.15	+		+	+		
77	1.34	31	+			+		
78	1.31	33	+			+		
79	0.95	30	+					
80	1.30	33	+			+		
81	1.78	197	+			+		
82	1.529	11.55	+		+	+		
83	1.671	97.17	+		+	+	+	
84	1.492	187.9	+					
85	2.26	131	+		+		+	
86	1.483	33.78	+		+	+		
87	1.760	32.43	+		+	+		
88	-	-	-	-	-	-	-	-
89	1.124	127.2	+		+			
90	1.046	68.01	+		+			
91	1.291	26.63	+		+			
92	1.167	48.95	+		+			
93	1.078	82.58	+		+			
94	1.288	53.68	+		+			
95	1.168	62.44	+		+			
96	1.802	31.47	+		+			
97	1.119	84.54	+		+			
98	1.333	39.99	+		+		+	
99	1.187	88.73	+		+			
100	1.501	17.98	+		+			
101	1.234	52.70	+		+			

¹ identificação das amostras

² razão entre absorvâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/ml

⁴ resultados da BGlob

⁵ resultados da PCR BMEII0987

⁶ resultados da PCR IS711

⁷ resultados da PCR B4B5

⁸ resultados da PCR BruAb2_0168

⁹ resultados da PCR BR00953

102	1.302	47.45	+	+			
103	1.785	25.02	+	+			
104	1.613	36.82	+	+			
105	1.613	36.82	+	+			
106	1.330	88.65	+	+			
107	1.287	89.77	+	+			
108	1.673	49.72	+	+			
109	1.377	51.17	+	+			
110	1.389	57.12	+	+			
111	1.276	32.37	+	+			
112	1.259	34.00	+	+	+		
113	1.083	116.9	+	+			
114	1.021	96.67	+	+			
115	1.194	55.38	+	+	+		
116	1.100	54.94	+	+			
117	0.984	109.2	+	+			
118	0.965	139.2	+				
119	1.130	52.01	+	+		+	
120	0.620	102.8	+	+			
121	1.411	48.09	+	+	+	+	
122	0.907	68.18	+	+			
123	0.968	119.4	+	+			
124	1.017	58.29	+	+			
125	1.244	61.10	+	+	+		
126	1.195	48.97	+	+	+		
127	1.518	17.59	+	+	+		
128	1.127	17.70	+	+	+		
129	0.923	12.03	+	+	+		
130	1.231	64.05	+	+	+		
131	1.170	41.32	+	+	+		
132	1.474	37.34	+	+	+	+	
133	1.339	75.00	+	+			
134	1.170	82.52	+	+	+		
135	1.210	74.88	+		+		
136	1.481	55.39	+	+	+		
137	1.313	96.58	+	+	+	+	
138	1.217	50.49	+	+		+	

¹ identificação das amostras

² razão entre absorvâncias registradas a 260 e 280nm

³ concentração de DNA em µg/ml

⁴ resultados da BGlob

⁵ resultados da PCR BMEII0987

⁶ resultados da PCR IS711

⁷ resultados da PCR B4B5

⁸ resultados da PCR BruAb2_0168

⁹ resultados da PCR BR00953

139	1.474	49.73	+		+	+	+
140	1.290	57.82	+		+		+
141	1.457	31.88					
142	1.526	139.3					
143	1.384	36.05					
144	1.680	29.66					
145	1.486	61.13				+	
146	1.368	29.77					
147	1.501	89.85					
148	1.326	69.21					
149	1.402	59.33					
150	1.571	88.07					
151	1.593	107.4					
152	1.511	59.17					
153	1.545	82.18					
154	1.562	66.68					
155	1.558	55.85					
156	1.787	106.7					
157	1.624	44.25					
158	1.667	167.5					
159	1.628	38.89					
160	1.581	73.45					
161	1.652	45.60					
162	1.714	153.6			+		
163	1.386	43.10					
164	1.492	51.58					
165	1.689	154.5					
166	1.676	168.6					
167	1.721	136.0				+	
168	1.602	79.87				+	
169	1.673	131.7					
170	1.621	75.70				+	
171 (citrato)	1.523	78.65		+	+	+	+
171 (colônia)	1.615	157.6		+	+	+	+
¹ identificação das amostras							
² razão entre absorvâncias registradas a 260 e 280nm							
³ concentração de DNA em µg/ml							
⁴ resultados da BGlob							
⁵ resultados da PCR BMEII0987							
⁶ resultados da PCR IS711							
⁷ resultados da PCR B4B5							
⁸ resultados da PCR BruAb2_0168							
⁹ resultados da PCR BR00953							

APÊNDICE 2 - NORMAS DA REVISTA

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (Impresso) B2

Diretrizes para Autores

Normas editoriais

O periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* é uma publicação trimestral, vinculada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e conta com o apoio da Fundação de Medicina Veterinária (FUMVET). Destina-se a publicar trabalhos científicos sobre medicina veterinária e ciências afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação da comissão editorial, com assessoria de especialistas da área (*peer review*). A lista de colaboradores (relatores) é publicada no último fascículo do volume/ano. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade dessa revista. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. Os trabalhos que tiverem a utilização de animais deverão apresentar a aprovação do protocolo experimental por Comitê de Ética. Qualquer que seja o tipo do trabalho deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente a esse periódico.

Os trabalhos para publicação deverão ser submetidos no portal de revistas da USP no URL:

<http://www.revistas.usp.br/bjvras>

Artigo completo

- 1** - Ser escrito em língua inglesa.
- 2** - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, não sendo contadas apenas as páginas onde constem tabelas e ilustrações.
- 3** - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo.
- 4** - Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão (se conveniente, é possível a associação dos tópicos “Resultados” e “Discussão”); e) Agradecimentos; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Keywords.
- 5** - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinquenta) palavras, seguidos das palavras-chave/Keywords, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Nota de Pesquisa / Relato de Caso

1 - Ser escrita em língua inglesa.

2 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas.

3 – Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo.

4 - Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos (Português e Inglês), com palavras-chave/keywords, conforme descrito na apresentação de artigo completo, além de referências.

Artigos de revisão

Só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da comissão editorial. Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos, etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos (Português e Inglês), com palavras-chave/keywords, conforme descrito na apresentação de artigo completo, além de referências.

Apresentação dos trabalhos

1 - Digitação: obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço 1,5, margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas. Todas as Ilustrações devem conter título, fonte e, caso necessário, legenda. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se as extensões: doc, rtf ou odt;

2 - Página de rosto: elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo (Português e Inglês), nomes por extenso dos autores, instituições de origem e endereço de email de todos os autores.

3 - Tabelas: devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas por um título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular**. 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da comissão editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra tabela (por extenso).

4 - Ilustrações (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas no texto. As ilustrações devem ser identificadas com o título e fonte. Fotos devem ter resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Os gráficos devem trazer sempre os valores

numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Para citar as ilustrações no texto indicar a nomenclatura por extenso conforme segue: se estiver entre parênteses utilizar letra maiúscula na inicial da palavra, ex: (Figura 1) e minúsculas se estiver inserida no texto, ex. figura 1. Indicar junto ao título da ilustração o local e data. Logo abaixo da ilustração indicar a fonte de origem mesmo sendo de autoria própria. As ilustrações serão publicadas coloridas na revista eletrônica, na revista em papel serão publicadas em preto e branco. Desta forma, recomendamos cuidados especiais para que seja possível uma boa leitura da imagem mesmo em preto e branco.

5 - Agradecimentos: a critério dos autores.

6 - Referências: As referências são organizadas por ordem alfabética e reunidas no final do trabalho. São digitadas com espaçamento simples, alinhadas à esquerda e não devem ser justificadas. Devem ser relacionados todos os autores, não usar a expressão et al. Os títulos de periódicos devem ser mencionados por extenso. As referências devem seguir a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados.

Exemplos de Referências:

- **Periódico**

KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelflife of sliced vacuum-pocked cooked ham. **Meat Science**, v. 42, n. 3, p. 333-345, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0309174095000380>>. Acesso em: 15 jun. 2014. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(95\)00038-0](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(95)00038-0).

- **Livro**

HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology**. London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

- **Autor diferente para livro e capítulo**

FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

- **Mesmo autor para o livro e capítulo**

THORTON, H. Deleterius changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection**. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

- **Tese**

BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (*Capra hircus*, L.) normais criados no Estado de São Paulo:** influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares.

1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

- **Evento**

OLIVEIRA, C. A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

- **Livro eletrônico**

POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle**. North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service, 1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>>. Acesso em: 23 abr. 2007.

- **Artigos de periódicos eletrônicos**

MENDONÇA JR., C. X.; MARTINS, A. P.; MORI, A. V.; SILVA, A. B.; MORI, C. S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípides plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5854>>. Acesso em: 31 jan. 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000100014>.

7 - Citações: utilizar o Sistema Autor Data, conforme ABNT NBR 10520. As citações devem ser apresentadas no texto e subordinar-se à forma (AUTOR, data), como no exemplo (SANTOS, 2001). Quando a citação estiver inserida no texto utilizar letra minúscula, ex.: Santos (2001).

Exemplo de citações:

Um autor - sobrenome do autor e data:

Valberg (1996) ou (VIEIRA, 1991).

Dois autores - sobrenome dos autores e data:

Strunk e White (1979) ou (STRUNK; WHITE, 1979).

Três autores – para referência que possui três autores, citar os três autores no texto.

Volpato, Gonçalves-de-Freitas e Jordão ou (VOLPATO; GONÇALVES-DE-FREITAS; JORDÃO, 2006).

Quatro ou mais autores - sobrenome do primeiro autor com a expressão et al. sem itálico.

Carvalho et al. (2003); Zogno et al. (2004) e Addo et al. (2007). ou (CARVALHO et al., 2003; ZOGNO et al., 2004; ADDO et al., 2007).

Tarifa de publicação: A tarifa de publicação de R\$ 400,00 será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da aprovação do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta do autor.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão deve estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
3. URLs das referências devem ser informadas.
4. O texto de estar em espaço 1,5; usar uma fonte de 12-pontos; empregar itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL).
5. O texto deve seguir os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página da Revista.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.