

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**DELCIVAN LIMA DOS SANTOS**

**LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE *BRUCELLA CANIS*  
UTILIZANDO O ELISA INDIRETO EM AMOSTRAS DE CÃES DO  
MUNICÍPIO DE CRUZ DAS ALMAS-BAHIA, BRASIL.**

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA

FEVEREIRO-2017

**DELCIVAN LIMA DOS SANTOS**

**LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE *BRUCELLA CANIS*  
UTILIZANDO O ELISA INDIRETO EM AMOSTRAS DE CÃES DO  
MUNICÍPIO DE CRUZ DAS ALMAS-BAHIA, BRASIL.**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao colegiado de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Co-orientador: Prof. MSc. Marcus Paulo de Matos Maturino

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA


FEVEREIRO-2017

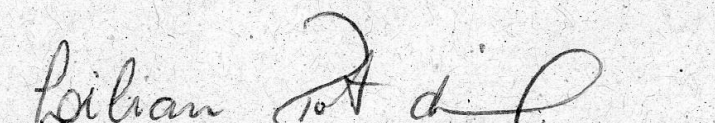
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

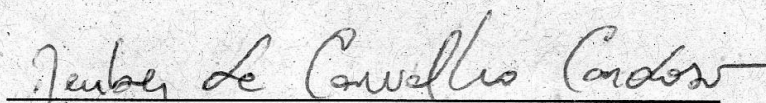
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DELCIVAN LIMA DOS SANTOS

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE *Brucella canis* UTILIZANDO O ELISA  
INDIRETO EM AMOSTRAS DE CÃES DO MUNICÍPIO DE CRUZ DAS ALMAS-  
BAHIA, BRASIL

  
Prof. MSc. Marcus Paulo de Matos Maturino  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

  
MSc. Lilian Porto de Oliveira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

  
MSc. Reuber de Carvalho Cardoso  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

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

## DEDICATÓRIA

*À meus pais Vera Lucia e Delcio, minhas irmãs Maruza e Camile, minhas sobrinhas Júlia e Amanda, meus familiares, meus amigos, Jade e Airon.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, por me acompanhar, e nunca me desamparar onde quer que eu vá, em todos os momentos de minha vida, sejam eles bons ou ruins.

A minha mãe por estar sempre comigo, acreditando em mim, me apoiando, me dando amor, sendo compreensiva, sendo minha amiga. Só nós sabemos o quanto foi difícil essa distância, o quanto nossas lagrimas caíram de saudade. Mãe, eu te amo, tú és o grande amor da minha vida, és o motivo de eu ser quem sou. Só estou aqui hoje por sua causa. Muito obrigado por ser essa mulher forte, batalhadora, e de bom coração. Muito obrigado por ser minha mãe...

Aos meus amigos Jânio, Marcelo, Tia Gracinha (*in memorian*) Djair, Bruno, Elias, Tia Jânia, Djalma, Maurício, Édico, Alessandro, Lucas, Vinicius, Andrine, Juliana, Kayck, Sylvania, Diana, Caline, Jaiala, Luana, Bianca, Lourival, William, Pedro, Keila, Gabriel, Stefany, Amanda. Embora a distância por vezes possa atrapalhar, verdadeiras amizades não acabam, não mudam. Obrigado pela compreensão.

Agradeço a Dona Meire, Ideraldo e Vinicius, por toda a ajuda que me deram, num momento que eu mais precisei.

Aos meus orientadores Robson Bahia, e Marcus Paulo, por toda a ajuda, empenho e ensinamento durante esse processo. Compartilhando o conhecimento também durante a graduação. Obrigado Professor Robson, ter sido seu estagiário.

A todos os professores que tive na graduação, onde fui amadurecendo meu intelecto pessoal, o senso de questionamento, e a busca por respostas.

Aos funcionários da limpeza, da manutenção, do restaurante universitário, os seguranças, os técnicos. Vocês podem até não saber, mas contribuíram muito para minha formação. Cada bom dia, cada risada, cada conversa, enriqueceu o meu ser. Gratidão a vocês.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a minha companheira de quatro patas, Jade, minha gatinha Amorosa, fiel e companheira. Meu muito obrigado á você. Amo-te, incondicionalmente. Agradeço também, a Airon, por ser um companheiro fiel e amoroso, principalmente de minha mãe, há 15 anos. Obrigado, meu velhinho.

Muito obrigado

## EPÍGRAFE

*“Porque ninguém vai dormir nosso sonho...”(Nando Reis)*

## RESUMO

A brucelose canina, causada pelo agente etiológico *Brucella canis*, é uma enfermidade infecto-contagiosa, de caráter zoonótico com distribuição cosmopolita. São bactérias gram negativas, de morfologia colonial rugosa, intracelular. Tem como hospedeiro principal os canídeos. Nos animais tem como sinais clínicos abortamentos nas fêmeas, orquites, prostatites, epididimites nos machos, e infertilidade em ambos os casos. Em humanos a doença é conhecida como “Febre de Malta”. Apesar da infecção ser sub-notificada, já foram observados e descritos casos em que o paciente manifestava febre, calafrios, sudorese profusa, fadiga muscular, mal estar, linfadenomegalia e perda de peso. Juntamente com esta sintomatologia pode haver complicações, incluindo endocardite, miocardite, pericardite, abscessos viscerais, hepatite, artrite e meningite. As vias de contaminação são as mucosas oronasais e genitais, lesões de pele e placenta. A infecção humana pode ocorrer pelo contato direto ou indireto com tecidos de animais contaminados, aerossóis e fômites. O diagnóstico é complexo porque os sinais clínicos não são patognômicos da doença. Sendo necessário o auxílio de exames que identifiquem o agente através do isolamento e sorologia. O tratamento também oferece riscos, uma vez que, a infecção pode retornar em animais que aparentaram terem tido sucesso no tratamento. Com o objetivo de se conhecer a prevalência de *Brucella canis* em cães de Cruz das Almas, Ba, foi feito um levantamento sorológico utilizando o ELISA indireto como teste confirmatório da exposição ao agente. Foi analisado 250 amostras. Destas, 66 foram consideradas positivas, demonstrando uma prevalência de 26,4 %.

Palavras chaves: brucelose canina, zoonose, infecto-contagiosa.



## ABSTRACT

Canine brucellosis, caused by the etiologic agent *Brucellacanis*, is an infectious-contagious disease, of a zoonotic nature with a cosmopolitan distribution. They are Gram negative bacteria, of rough, intracellular colonial morphology. It has as main host the canids. In animals the clinical signs are abortions in females, orchitis, prostatitis, epididimites in males, and infertility in both cases. In humans the disease is known as "Maltese Fever", although the infection is under-reported, cases where the patient manifested fever, chills, profuse sweating, muscle fatigue, malaise, lymphadenomegaly and weight loss have been observed and described. Along with this symptomatology there may be complications, including endocarditis, myocarditis, pericarditis, visceral abscesses, hepatitis, arthritis and meningitis. The routes of contamination are the oronasal and genital mucosa, lesions of skin and placenta. Human infection can occur through direct or indirect contact with tissues from contaminated animals, aerosols and fomites. The diagnosis is complex because the clinical signs are not pathognomonic of the disease. It is necessary the assistance of tests that identify the agent through the isolation and serology. Treatment also poses risks, as the infection may return in animals that appeared to have been successful in treatment. In many cases, the animal is sacrificed, with the purpose of containing the disease progression, being at the discretion of the veterinarian the choice of protocol to be followed. With the objective of knowing the prevalence of *Brucellacanis* in dogs from Cruz das Almas, Ba, a serological survey was performed using the indirect ELISA as a confirmatory test of the exposure to the agent. 250 samples were analyzed. Of these, 66 were considered positive, demonstrating a prevalence of 26.4%.

Key words: canine brucellosis, zoonosis, infectious-contagious.

## ÍNDICE

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3.0 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
3.1 HISTÓRICO .....	13
3.2 AGENTE ETIOLÓGICO .....	13
3.3 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS .....	14
3.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	15
3.5 TRANSMISSIBILIDADE .....	17
3.6 RESPOSTA IMUNE .....	19
3.7 PATOGENIA .....	19
3.8 SINAIS CLÍNICOS .....	21
3.9 DIAGNÓSTICO .....	23
3.9.1 ASPECTOS CLÍNICOS .....	23
3.9.2 ASPECTOS LABORATORIAIS .....	23
3.9.2.1 BACTERIOLÓGICO .....	23
3.9.2.2 SOROLÓGICO E TÉCNICAS MOLECULARES .....	25
3.10 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS .....	27
3.11 TRATAMENTO .....	28
3.12 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO .....	28
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 ÁREA DE ESTUDO .....	30
4.2 COLETA DE AMOSTRAS .....	31
4.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS .....	31
4.4 ESTUDO ESTATÍSTICO .....	34
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6.0 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
<b>ANEXOS</b> .....	44

## 1.0 INTRODUÇÃO

A Brucelose, doença infectocontagiosa causada pela *Brucella canis*, é considerada uma zoonose com distribuição cosmopolita. É uma enfermidade de caráter crônico, sendo responsável por diversas desordens reprodutivas em cães. A infecção é normalmente assintomática e mais raramente está associada a problemas reprodutivos, dentre eles abortamento, orquites, prostatites, epididimites e falhas na concepção. A cronicidade da doença ocorre frequentemente, caracterizando-se por bacteremia intermitente. O principal meio de transmissão nos animais é através do contato social, sendo de origem venérea e/ou pelo contato direto com animais infectados.

Em humanos, a Brucelose é conhecida como “febre ondulante”, “febre do mediterrâneo” ou “febre de Malta”. A mucosa oronasal é o principal meio de entrada da bactéria, e por contato direto com secreção contaminada e/ou indireta, pelo consumo de produtos de origem animal, como leite e queijo (WHO, 2006). Os danos causados pela infecção podem variar de acordo com o sistema imune de cada indivíduo (ROXO *et al.*, 1990). Azevedo *et al.* (2003) relataram um caso, em São Paulo, de Brucelose em um adolescente de 14 anos que apresentou febre, sudorese profusa, forte sensação de cansaço, e sintomas psicóticos, com quadro depressivo intercalado com histerismo, confusão mental, rigidez da nuca e priapismo. A suspeita da fonte da infecção recaiu sobre uma cadela da raça Doberman, positiva para a sorologia de *B. canis*. Além de ser uma zoonose, a brucelose canina também apresenta importância econômica aos criadores de cães comerciais, devido a sua frequência elevada. A infecção é altamente contagiosa, e uma vez estabelecida em populações caninas confinadas, se espalha rapidamente, causando problemas econômicos oriundos das perdas reprodutivas.

Em 1966 Carmichael, fez o primeiro isolamento de *Brucella canis*, nos Estados Unidos durante um inquérito sobre a causa de abortos em cães da raça Beagle. Em 1976, no Brasil, ocorreram os primeiros relatos de isolamento do agente no Rio grande do Sul, e em São Paulo. Com o passar dos anos e os avanços tecnológicos, há relatos do isolamento do agente em amostras de sangue, urina, sêmen, swab vaginal e medula óssea. Diversos estudos foram realizados no Brasil através de

inquéritos soroepidemiológicos e foi detectada alta prevalência em diversas regiões do país. Sendo realizados estudos em zonas urbanas, rurais, com animais domiciliados, semi domiciliados, animais errantes, e animais de canis particulares e públicos, comprovando que *B. canis* está amplamente disseminada.

Assim sendo, em razão do caráter zoonótico e dos sérios riscos a saúde humana e animal, já que existe uma relação afetiva entre o homem e o cão, objetivou-se com este trabalho realizar uma investigação sorológica de *B.canis* em amostras de cães do município de Cruz das Almas, Bahia.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento sorológico utilizando o Elisa indireto para diagnóstico de *Brucella canis* em cães do Município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar um teste de Elisa indireto descrito na literatura para utilizar na investigação sorológica de *Brucella canis*.
- Avaliar amostras de soro canino oriundas de bairros residenciais situados no Município de Cruz das Almas-Ba –
- Investigar aspectos sorológicos da enfermidade no Município de Cruz das Almas-Ba.

### 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 HISTÓRICO

A Brucelose foi descrita pela primeira vez por Marston, em meados de 1863, com um relato de uma enfermidade que denominou “Febre gástrica remitente do mediterrâneo” (CORRÊA; CORRÊA, 1992). No ano de 1887 o médico inglês David Bruce isolou e descreveu o agente, denominando-o de *micrococcusmelitensis*. O agente foi isolado do baço de quatro soldados que foram vítimas da infecção, na ilha de Malta (PACHECO; MELO, 1956).

Carmichael *et al.*, (1996), isolaram *B. canis* da placenta, do tecido fetal, e de descargas vaginais de cadelas fêmeas da raça Beagle, onde foi possível descrever o agente causal do aborto nas cadelas (MEGID *et al.*, 2002), confirmando também a patogenicidade para o homem, definindo o papel do cão como reservatório da bactéria (GERMANO, 1987).

No Brasil, a Brucelose canina foi descrita pela primeira vez por Godoy *et al.*, (1977), em Minas Gerais, onde foi isolado *Brucella canis* em hemocultura de uma cadela que havia abortado recentemente. Em São Paulo, Larsson *et al.*, (1980), conseguiram isolar três amostras de *B. canis*, sendo que uma era de uma fêmea que tinha histórico de infertilidade, e as outras era um de macho e uma fêmea, sem sinais clínicos. No Rio de Janeiro, Ferreira (2003) isolou e identificou *B.canis* de dois cães que tinham sintomatologia clínica de Brucelose canina de um canil comercial (GOMES, 2007).

#### 3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente da brucelose canina, *Brucella canis*, é uma bactéria intracelular, de morfologia colonial rugosa Gram negativa. Pertence ao gênero *Brucella*, sendo composto por nove espécies conhecidas hoje em dia: *B.abortus*, *B.suis*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. pinnipedialis*. O

gênero *Brucella* é formado por cocobacilos imóveis, com 0,4 a 2,5 $\mu$  de comprimento por 0,4 a 0,8 $\mu$  de largura. No geral, encontram-se isolados, e com menos frequência, em pares, unidos pelas extremidades ou em grupos pequenos. Não formam cápsulas, esporos, ou flagelos e são aeróbios, (MENDES; MARCONDES-MACHADO, 2005). *B. canis* tem uma característica peculiar, podendo apresentar colônias de aspecto mucoide (CARMICHAEL; KENNY, 1970).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS

A estrutura mais característica das bactérias gram-negativas é o seu envelope celular, formado por uma membrana citoplasmática, um espaço periplasmático rico em proteínas solúveis intermediárias, e uma membrana externa (MORIYON *et al.*, 2002). O último é, sem dúvida, a estrutura de interesse do ponto de vista taxonômico, epizootico, antigênico, imunológico, diagnóstico e patogênico, devido à sua composição química particular e estrutura antigênica. Por não possuir cápsula, encontra-se em contato direto com o meio e contém em sua superfície os componentes antigênicos mais importantes conhecidos como Antígenos de superfície (CRESPO, 1994).

A membrana citoplasmática contém uma bicamada lipídica, composta por fosfolipídios e ácidos graxos, formando unidades hidrofóbicas e gliceróis. A parede rígida do peptidoglicano é formada por dois derivados de açúcares: N-acetil-glucosamina e N-acetil-murâmico, responsáveis pela forma e integridade osmótica da bactéria (RAMÍREZ, 2006).

O espaço periplasmático contém enzimas, alguns dos quais desintoxicam agentes nocivos provenientes do ambiente, proteínas relacionadas com o transporte de nutrientes e enzimas, sobre as quais atuam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (CRESPO, 1994). A membrana externa (ME), separada da parede de peptidoglicano pelo espaço periplasmático, é a barreira entre a bactéria e o meio ambiente, e a primeira a entrar em contato com o sistema imune do reservatório (LUCERO *et al.*, 2005), contém assimetricamente distribuídos fosfolipídios, proteínas e uma camada de lipopolissarídeo (LPS). A simetria na distribuição do LPS e das proteínas que

atuam como poros da membrana externa (Porinas), atua como uma barreira de permeabilidade contra muitos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos (MORIYÓN *et al.*, 2002).

A camada de LPS é constituída dos antígenos estruturais mais importantes do gênero *Brucella* (KIRK, 1997; VADILLO *et al.*, 2002), constituída de uma parte glicolípida (Lípido A) inserida na membrana externa, e, portanto, não visível na superfície, e um outro polissacarídeo direcionado para o exterior. Esta última se divide em duas sessões o núcleo e a cadeia O. As espécies de *B. canis* e *B. ovis* (Rugosas) não possuem a cadeia O, e as outras que possuem esta característica (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, que são espécies lisas), podem perder por mutação (MutaçãO R) (MORIYÓN *et al.*, 2002).

*B. canis* possui em comum com as outras espécies de *Brucella*, numerosos antígenos somáticos, os quais podem ser demonstrados facilmente mediante estudos com imunodifusão em gel com antígenos solúveis extraídos mediante a ruptura das células com ultrassom e outros métodos. No entanto, a natureza mucoide (Rugosa) confere a parede celular desta bactéria propriedades antigênicas diferentes das cepas lisas de outras bactérias do mesmo gênero, pelo qual utilizam-se técnicas altamente padronizadas que são utilizadas para o diagnóstico da infecção causada por *B. canis* (DÍAZ *et al.*, 1968). Tem sido demonstrado reações cruzadas de aglutinação e precipitação entre *B. canis* e outras espécies de brucelas em estado rugoso como *B. ovis* e *B. abortus*; Da mesma maneira se produzem reações cruzadas entre *B. canis* e algumas outras bactérias gram negativas em fase rugosa, como *Actinobacterbrochisepticus* (antes *Bordetellabronchiseptica*) *Actinobacillusequuii* (JONES e BRINLEY, 1958; CARMICHAEL *et al.*, 1989; MEGID *et al.*, 1999) e com *Pseudomonaaeruginosa* (FLORES e CARMICHAEL, 1981).

### 3.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Já se sabe que o cão é uma fonte de infecção de diferentes tipos de *Brucella*. Há algum tempo atrás, o cão era negligenciado devido a sua resistência às infecções natural e experimental por *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*. Essas



espécies podem infectar o cão, entretanto, são de ocorrência esporádica. Normalmente resultam do contato desses cães de zona rural, com produtos de origem animal, estando contaminados ou da ingestão de restos de abortamentos contendo *Brucella*.

Diversos estudos foram conduzidos no Brasil, no que diz respeito à identificação, isolamento do agente, e inquéritos sorológicos, demonstrando a importância epidemiológica e clínica do agente na população de canina (AZEVEDO et.al 2004). *B. canis* possui caráter zoonótico importante, e deve ser considerado, mediante os relatos de casos em humanos no Brasil e no mundo (AGUIAR et al., 2005), e sobretudo pelo contato direto estabelecido entre os cães e as crianças. Cada espécie de *Brucella* tem preferência por um determinado tipo de hospedeiro, mas todas podem infectar uma variedade enorme de animais, incluindo o homem (JAWETS, 2000). Souza et al., (2002), relataram que para se considerar *B. canis* como um problema de importância epidemiológica, basta que apenas uma parte da população seja positiva para o agente, dado o caráter zoonótico da enfermidade.

Carmichael et al., (1968), descreveram primeiramente a infecção no homem, em dois laboratoristas, que foram infectados acidentalmente, enquanto manipulavam amostras de *B. canis* (LARSSON, 1980). Em todo o mundo existem casos de infecções naturais, bem como casos de infecções adquiridas em laboratório, como doença ocupacional. Em humanos, a pele lesionada e mucosa são as vias mais comuns de infecção. Azevedo et al., (2004) relataram que a os principais sintomas em humanos é febre, calafrios, sudorese profusa, fadiga muscular, mal estar, linfadenomegalia e perda de peso. Juntamente com esta sintomatologia pode haver complicações, incluindo endocardite, miocardite, pericardite, abscessos viscerais, hepatite, artrite e meningite.

Em pacientes diagnosticados com Brucelose foram observadas alterações hematológicas como leucopenia, anemia hemolítica microangiopática, pancitopenia e trombocitopenia severa. Em alguns casos, essas alterações podem ser predominantes em uma fase precoce da infecção, escondendo a etiologia infecciosa da doença, e fazendo com que pareça uma enfermidade hematológica primária.

O gênero *Brucella* também pode infectar o trato genitourinário do homem, como resultado da infecção sistêmica, podendo causar, nesse caso, epididimite,

orquite e granuloma renal. Mesmo que esses agentes provoquem abortos em animais infectados secundariamente á seu local na membrana corioamniótica da placenta, no aborto espontâneo humano existem poucas evidências da participação do agente. Os microrganismos podem ser isolados do líquido amniótico e de tecidos placentários de mulheres com brucelose, porém, esses casos são raros (KONEMAN *et al.*, 2001).

Segundo Hollet (2006) as raças que possuem mais predisposição são Beagles, Labradores, Cocker Spaniels, Pastores Alemães, Poodles e Boston Terriers. Cães de qualquer faixa etária são susceptíveis á *B. canis*. No que diz respeito a caracterização racial dos cães, prevalecem indivíduos sem raça definida. Em cães de raça definida, a predominância é pelo Pastor Alemão e Poodle. (SOUZA *et al.*, 2002).

Segundo Corrêa e Corrêa (1992) o sexo, clima e a estação do ano não tem influência na apresentação da doença, uma vez que, a idade é fator determinante, pois são muito mais infectantes para animais que estão na maturidade sexual, ainda que possa ocorrer em animais mais jovens.

Segundo Hirsh e Zee (2003), a probabilidade de que cães de áreas suburbanas sejam infectados por *B. canis* é pequena. Isso acontece porque a prevalência de infecção é maior em áreas carentes. Lugares fechados, onde os animais ficam confinados, como canis, aumentam os riscos de transmissões de infecções.

A brucelose é uma doença endêmica, e não existe letalidade e mortalidade, sendo assim, o animal adulto infectado não morre em razão da enfermidade. A morbidade é muito variável. Em comparação com um lote de animais, o índice varia de 10 a 50% (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A prevalência varia em relação com a área geográfica e do tipo de teste utilizado (GOMES *et al.*, 1999).

### 3.5 TRANSMISSIBILIDADE

A forma mais comum de transmissão de *B.canis* é a ingestão, inalação e a manipulação de tecidos placentários e descargas vaginais de fêmeas que abortaram devido a infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1998; JOHNSON; WALKER, 1992). As fêmeas acometidas por *B. canis* são consideradas como fonte de infecção não apenas durante o abortamento, mas também no período do estro e no ato da cobertura. A via transplacentária também é uma importante via de transmissão (COUTO; NELSON, 2001). No leite a concentração bacteriana é alta, no entanto existem controvérsias no que diz respeito a disseminação da doença, já que os fetos podem ser contaminados pela via transplacentária (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Cães machos que são infectados por *B. canis* podem apresentar uma enorme quantidade de microrganismos na urina e a mesma torna-se muito infectante (MOORE, 1969; CARMICHAEL; GREENE, 1998; DZIEZYC, 2000). A bacteriúria tem início pouco depois da bacteremia, durando aproximadamente três meses em concentrações que variam de 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> UFC/ml (CARMICHAEL; JOUBERT, 1988).

Outra importante via de infecção por *B. canis*, é o sêmen de animais infectados, principalmente no período de três a 11 semanas após a infecção, servindo como uma importante via de eliminação do agente, o que pode tornar a inseminação artificial uma via de transmissão bastante eficiente (MOORE E KAKUK, 1969; GEORGE *et al.*, 1979), mesmo que *B. canis* não seja recuperada do sêmen após 60 semanas do início da infecção (GEORGE *et al.*, 1979), o microrganismo pode ser eliminado por via seminal intermitentemente por até dois anos (GEORGE *et al.*, 1979).

Foram isoladas baixas concentrações da bactéria na saliva, secreção ocular e nasal, e nas fezes de animais infectados, sendo considerados de pouca importância como possíveis vias de eliminação do agente (WEBER; CRISTOPH, 1982). A transmissão por fômites também vem sendo estudada, mesmo sabendo que *B.canis* não sobreviva durante muito tempo no meio ambiente, e seja facilmente destruída por desinfetantes comuns ou pelo calor (JOHNSON; WALKER, 1982; CARMICHAEL; GREENE, 1998). A bactéria também já foi isolada de carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), oriunda de uma cadela doente, alertando o papel destes aracnídeos na transmissão desta enfermidade (PERES *et al.*, 1981).

### 3.6 RESPOSTA IMUNE

A infecção por *B. canis* induz respostas imunes principalmente mediadas por células, já que dependem da ativação dos macrófagos, as quais variam por fatores tais como patogenicidade da cepa infectante, idade, estado nutricional, tratamentos prévios com antibióticos e estado imune do hospedeiro. Os anticorpos circulantes também desempenham certo papel na imunidade, mas há pouca correlação entre os títulos de anticorpos e o grau de resistência. Depois da infecção, aumentam a concentração de IgM (detectado nas primeiras semanas pós-infecção, começando a diminuir após 3 meses), e a IgG começa a aumentar na segunda semana de infecção e persiste por pelo menos um ano em pacientes não tratados, diminuindo para 6 meses, se for feito o tratamento. Se houver um aumento persistente, é atribuído a presença de microrganismos intracelulares viáveis no tecido reticuloendotelial ou focos de infecção (COTRINO *et al.*, 2003).

O aumento da atividade exercida pelos macrófagos para eliminar a bactéria deve-se a um tipo de interleucina, a linfocina, que é liberada por linfócitos T específicos, uma vez que são reconhecidos pelo antígeno bacteriano e pelos componentes do complexo maior de histocompatibilidade na superfície do macrófago (GONZÁLEZ *et al.*, 2004).

### 3.7 PATOGENIA

As bactérias do gênero *Brucella* infectam seus hospedeiros de preferência ou acidentais, através das mucosas, e nessas incluem as do trato digestivo, respiratório, genital e conjuntiva. Dependendo da espécie, a via de transmissão pode ser venérea, nesse caso *B. canis* e *B. ovis*, mas nos ruminantes a principal porta de entrada da bactéria é a mucosa orofaríngea. Logo em seguida são fagocitadas, principalmente pelos macrófagos e são carregados para os linfonodos, onde se multiplicam e permanecem por semanas a meses. Depois de transcorrido a infecção, as células do sistema mononuclear fagocitário, basicamente macrófagos, ligam-se

ao agente por meio de receptores específicos ou com a ajuda dos anticorpos opsonizantes. A bactéria é interiorizada, digerida e suas frações antigênicas são apresentadas (expostas) na superfície da membrana celular. Anticorpos da classe IgM são os primeiros a serem produzidos, mais ou menos do quinto ao sétimo dia após a infecção. Alcança níveis máximos por volta do décimo terceiro ao vigésimo primeiro dia, acompanhados pelos anticorpos IgG, que são detectáveis um dia após a IgM, atingindo a máxima concentração sorológica entre 28 e 42 dias. Nos indivíduos infectados por *Brucella* os níveis de IgM diminuem de forma rápida, mas os níveis de IgG persistem, dentre eles o IgG1, principal subclasse de anticorpos encontrados no soro sanguíneo de animais infectados. Depois da multiplicação, o agente atinge a corrente sanguínea pelo ducto torácico, internamente nos macrófagos, ou livres no plasma. Espalham-se para os tecidos do hospedeiro, colonizando sobre tudo órgãos que são ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, incluindo baço, fígado e linfonodos (sobretudo os supramamários), causando alterações inflamatórias e anatomopatológicas, levando a esplenomegalia, hepatomegalia, e em alguns casos, hiperplasia linfóide (BISHOP, *et al.*, 1994).

*B. canis* tem tropismo e infecta preferencialmente os testículos, próstata, útero e vagina dos cães. Na urina dos machos existem uma grande quantidade de bactérias isoladas, comprovando a capacidade que a bactéria tem de infectar a próstata. Sendo assim, podem ocorrer dermatite escrotal como resultados das lambeduras frequentes, devido a dor da epididimite, podendo haver infecção por *Staphylococcus aureus* (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Em cães infectados por mais de cinco semanas, observou-se uma diminuição do volume seminal e ejaculação com exacerbação dolorosa, mas a libido desses animais não sofreu alterações. Com a persistência da infecção, normalmente 8 semanas, as alterações espermáticas ficam mais severas. Incluindo cauda fortemente enrolada, cabeça em destaque, peça intermediária dobrada e acrossomas deformados. Nesta condição, a motilidade espermática é bastante reduzida. Essas alterações que acontecem no sistema reprodutivo dos machos levam a um diagnóstico desfavorável, causando, portanto, infertilidade (GEORGE *et al.*, 1979).

*B. canis* pode infectar e se instalar em outros tecidos, levando a quadros de discoespondilite, uveíte, endocardite, glomerulonefrite e meningite. Na infecção por via oral, os linfonodos retrofaríngeos apresentam-se aumentados de volume, e as fêmeas infectadas por via vaginal geralmente apresentam os linfonodos inguinais superficiais aumentados de volume. Esse aumento pode ser palpável logo na segunda semana após infecção. Com o desenvolvimento da doença, outros linfonodos podem ser atingidos, causando também esplenomegalia. É comum ser observado a presença de infiltrado de células inflamatórias em todos os órgãos que compõe o tecido genitourinário. Mesmo com todas essas alterações, muitos cães podem ser portadores assintomáticos da infecção, podendo facilmente estar eliminando o agente através de secreções, e pela cópula, tornando-se uma fonte de infecção para outros animais, inclusive o homem (KEID *et al.*, 2006, WANKE, 2004).

Entretanto, cães que foram recuperados apresentaram resultados negativos ou títulos baixos de anticorpos aglutinantes, e tornaram-se imunes a infecção, reforçando a participação da imunidade celular na proteção contra a infecção por *B.canis* (CARMICHAEL, 1976; CARMICHAEL; GREENE, 1990).

### 3.8 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos de *B.canis* não são fáceis de serem observados, e na maioria das vezes estão associados a distúrbios no trato digestivo. A doença é silenciosa, em razão disso os animais acometidos são assintomáticos (CARMICHAEL, 1966; DZIEZYC, 2000). Nas fêmeas o abortamento é o sinal clínico mais clássico da infecção por *B. canis*. Acontece entre os 30 e 57 dias de gestação, mas a frequência de ocorrência está entre os 45 e 55 dias (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; GREENE 1998). O abortamento ocorre normalmente no terço final da gestação, entretanto, pode acontecer antes do 20º dia de gestação, com reabsorção fetal, fazendo com que muitos proprietários passem a crer e a afirmar erroneamente que não houve concepção, ou suspeitarem que o animal seja infértil. Normalmente os fetos abortados apresentam-se parcialmente autolisados, edemaciados, congestos, hemorragia na região abdominal, líquido

peritoneal serosanguinolento, lesões degenerativas em fígado, intestinos e baços (CARMICHAEL; KENNEDY, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1998; JOHNSON; WALKER, 1992). Após o abortamento, as cadelas apresentam secreção vaginal serosanguinolenta durante alguns dias, podendo perdurar por várias semanas em alguns indivíduos (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Alguns animais podem resistir a infecção intra-uterina, mas nascem debilitados, e na maioria das vezes não sobrevivem até a puberdade, e em muitos casos apresentam linfadenopatia periférica (CARMICHAEL; KENNEDY, 1970; CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998). Nos machos, o achado mais frequente da presença da infecção é a orquite, epididimite, uni ou bilateral e prostatite (SCHOEB e MORTON, 1978; JOHNSON e WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998). Nesses casos, observa-se o aumento do volume escrotal, devido ao acúmulo de líquido serosanguinolento na túnica vaginal, e dermatite escrotal, normalmente associada a infecção bacteriana secundária (JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL, 1998). Em casos de infecção crônica pode ocorrer atrofia testicular uni ou bilateral (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

Os prejuízos de ordem espermática acontecem devido a produção de anticorpos contra os espermatozoides, encontrados no soro sanguíneo e no plasma seminal. Isso provoca aglutinação espermática, tornando-se um fenômeno imunomediado e sendo a causa da infertilidade nos machos (SERIKAWA *et al.*, 1984). Diversas anormalidades podem ser encontradas no sêmen de animais infectados, e também a presença de células inflamatórias (CARMICHAEL, 1998). As mais frequentes alterações espermáticas encontradas no sêmen de animais são: Espermatozoides imaturos, retenção de gota citoplasmática, cauda dobrada, inchaço da peça intermediária, e azoospermia (GEORGE *et al.*, 1979; SERIKAWA *et al.*, 1984; JOHNSON; WALKER, 1992).

Fora do meio reprodutivo, *B. canis* pode causar uveíte anterior (SAEGUSA *et al.*, 1977), meningoencefalomielites, dermatite piogranulomatosa (PURVIS, 1981), endocardite (YING *et al.*, 1999), glomerulonefrite, osteomielite e discoespondilite (DZIEZYC, 2000), linfadenopatia generalizada, perda de libido, letargia, envelhecimento precoce, são sintomas inespecíficos que são muitas vezes encontrados, e quem não tem predileção com o sexo (CARMICHAEL, 1998).

### 3.9 DIAGNÓSTICO

#### 3.9.1 ASPECTOS CLÍNICOS

O diagnóstico clínico de *B. canis* é difícil de estabelecer porque a sintomatologia é bastante inespecífica e variável. Quando existe o histórico de aborto, e falhas reprodutivas, mediante a epidemiologia, pode-se estabelecer a suspeita clínica. O contato com secreções oriundas de abortamento e secreções vaginais e líquidos fetais, é considerado importante fonte de transmissão do agente. Os machos podem apresentar inflamações como epididimite e orquite, e pode ocorrer perda de libido. As fêmeas podem apresentar secreções vaginais, pseudociese, piometra, aborto, redução de filhotes gerados e malformação congênita (AZEVEDO, 2004).

Outros sinais como atrofia testicular, dermatite escrotal, linfadenite e outros sinais que raramente ocorrem como discopatias, doenças articulares, uveíte e meningite, podem acontecer. É utilizado o exame ultrassonográfico como auxílio a suspeita clínica. Os animais acometidos podem apresentar esplenomegalia e hepatomegalia. Sendo assim, a partir da suspeita, deve-se coletar material para análise e posteriormente uma possível comprovação laboratorial, mediante a identificação e o isolamento do agente. (JOHNSON & WALKER, 1992; WANKE, 2004)



### 3.9.2 ASPECTOS LABORATORIAIS

#### 3.9.2.1 BACTERIOLÓGICO

A bactéria pode ser cultivada, isolada e identificada mediante a obtenção de amostras de material biológico colhido de forma asséptica. O material deve ser acondicionado em local apropriado e encaminhado o mais rápido possível ao destino final, nesse caso, o laboratório. Dependendo do tempo de chegada do material biológico ao laboratório, é importante que a amostra seja congelada, a  $-20^{\circ}$ , para que não se perca a viabilidade de *B. canis* (CARMICHAEL, 1998).

O sangue total é o material de eleição para se fazer a hemocultura, já que nem sempre haverá fetos abortados, e secreções vaginais para serem utilizados, uma vez que a bacteremia permanece durante longos períodos. Após a infecção, a bacteremia pode ser detectada 2 a 4 semanas, sem tratamento pode persistir por mais de cinco anos. O agente pode ser isolado de vários tipos de tecidos e secreções, como sangue, medula óssea, baço, linfonodo, fígado, próstata, sêmen, urina, fetos abortados e secreções vaginais no período de estro, no pós-parto e pós-aborto. A bacteremia pode não estar presente na fase crônica da doença. Isso porque necessita de um tempo mínimo de dez dias para se obter resultados. Sendo assim, a hemocultura não deve ser a única alternativa de identificação do agente (JOHNSON; WALKER, 1992).

O isolamento e a identificação de *B. canis* é um método que é considerado como sendo de alta especificidade diagnóstica, entretanto sua sensibilidade é considerada baixa porque pode ser alterada em razão de vários fatores, como eliminação intermitente, amostras mal coletada e mal conservada, e o uso de antimicrobianos. *B. canis* é considerado um patógeno de biossegurança 3, nesse caso, seu isolamento deve ser feito em laboratórios que tenham instalações adequadas para este objetivo (TEIXEIRA; VALLE, 1996).

Em fêmeas, as amostras podem ser coletadas na gestação, ou na fase de estro. O material colhido pode ser de útero e placenta, além de fluídos vaginais e uterinos (CARMICHAEL, 1990). Mesmo que o feto esteja morto, é importante coletar

amostras de líquidos e membranas fetais, assim como nos casos de nascimentos de ninhadas pequenas, filhotes fracos e natimortos (JOHNSON; WALKER, 1992).

O cultivo de *B. canis* geralmente produz muitas unidades formadoras de colônias (UFC), transcorrido um período de 3 a 11 semanas após a infecção. Em contra partida, o diagnóstico pode ser negativo porque a eliminação do agente pode ser intermitente e em baixas concentrações no sêmen (CARMICHAEL, 1990; CARMICHAEL; GREENE, 1998).

A amostra de urina é um método bastante eficaz. De 8 a 30 semanas após a infecção, poder ser obtido um resultado positivo (CARMICHAEL; GREENE, 1990).

### 3.9.2.2 SOROLÓGICO E TÉCNICAS MOLECULARES

A sorologia é um método utilizado na rotina diagnóstica, e devem identificar em quais amostras terão anticorpos anti *B. canis*. Os testes devem ser capazes de identificar e diferenciar a resposta imune contra o agente em questão, da resposta humoral à infecção por outros agentes. Pode ocorrer reação cruzada, sendo assim, é importante utilizar dois testes sorológicos porque cada teste identifica etapas diferentes da infecção. A maioria desses testes são rápidos e de fácil execução.

Diversos trabalhos envolvendo o Elisa vem sendo utilizados para sorodiagnóstico de *Brucella canis* na Bahia. Em 2003, Marcus Ribeiro Borges utilizou esta técnica pela primeira vez em sua tese de mestrado. O trabalho teve o seguinte título: avaliação da imunoreatividade de soros caninos a dois extratos solúveis de *Brucella canis*. Neste trabalho foi comparado o perfil de reconhecimento de IgG sérica a dois extratos solúveis de *Brucella canis*, preparados de diferentes formas. Os soros foram analisados por ELISA Indireto com os dois extratos solúveis obtidos por calor e Ultrassom. Foram testadas 765 amostras de soros de cães domiciliados da cidade de Salvador e área metropolitana com sorologia desconhecida, 92 amostras de soros testadas no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo (CCZ-SP) pelo método IDGA com antígeno de *Brucella ovis* sendo 45 positivas e 47 amostras negativas (RIBEIRO, MARCOS BORGES, 2003).

A SORO-AGLUTINAÇÃO RÁPIDA EM LÂMINA (SAR): é um teste mais utilizado na triagem de infecções por *B. canis*. É um teste de fácil aplicabilidade, rápido, barato e pode ser feito em qualquer clínica veterinária (CARMICHAEL; SHIN, 1996). Na SAR é utilizado um antígeno feito com a *B. ovis*, corado com rosa de bengala. Em relação a outros testes, apresenta várias vantagens, dentre eles a precocidade no diagnóstico, pois revela a presença de anticorpos a partir de três a quatro semanas de infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1998).

A SORO-AGLUTINAÇÃO LENTA EM TUBO (SAL): demonstra os resultados em titulação, e em muitos casos é utilizado para a confirmação da SAR-2ME (CARMICHAEL, 1998). Este teste é considerado mais específico e menos sensível que a SAR. Pode ser indicado como método para monitorar e quantificar a resposta sorológica de cães infectados e tratados (JOHNSON; WALKER, 1992, CARMICHAEL; GREENE, 1990).

A IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAR (IDGA): é considerado o teste oficial para Brucelose canina (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Demonstra precipitinas no soro de cães, entre cinco a dez semanas pós-infecção (CARMICHAEL; GREENE, 1993). O método é tido como mais específico que o teste de soroaglutinação rápida usando 2ME, mas ainda é propício a resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp (JOHNSON; WALKER, 1992).

A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO (CFT): é um teste utilizado para confirmação do diagnóstico de infecções por *B. ovis* e *B. abortus*, e possui alta especificidade e sensibilidade. Mas é pouco utilizada na rotina para diagnóstico da infecção de cães por *B. canis* (AZEVEDO *et al.*, 2004).

O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA): são utilizados antígenos da parede de *B. canis* (SERIKAWA; MURAGUCHI; 1979) e da parede de *B. abortus*, que é comum a várias espécies de *Brucella* (BALDI, *et al.*, 1994). A vantagem desses testes é que não apresentam reação cruzadas com outras bactérias que não sejam desse gênero. O ELISA indireto é bastante específico, mas é menos sensível que a SAL no que diz respeito a triagem de cães infectados (CARMICHAEL; GREENE, 1998). O ELISA tem sido considerado mais sensível do que os testes sorológicos de aglutinação (WANKE, *et al.*, 2002). Testes de ELISA indireto com antígenos extraídos por solução salina aquecida de amostra não mucoide de *B. canis*

demonstraram melhor sensibilidade (MATEU-DE ANTONIO *et al.*, 1993). Antígenos purificados também tem sido indicado para o teste de ELISA, para diagnóstico confirmatório aos testes de triagem, para substituir os testes com 2ME ou gel difusão (LUCERO, *et al.*, 2002; EBANI, *et al.*, 2003).

A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR): é uma reação que apresenta uma maior sensibilidade no diagnóstico no que diz respeito ao diagnóstico da brucelose canina, sobretudo quando é comparada ao isolamento em meio de cultivo. É um teste que possui um maior custo, em relação ao cultivo, mas o diagnóstico confirmatório para identificação de animais infectados é mais rápido (KEID, 2006).

### 3.10 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

A enfermidade causada por *B. canis* invade os tecidos do sistema reticuloendotelial, e vasos sanguíneos de órgãos reprodutivos. Os linfócitos, células plasmáticas e reticulares são as principais células envolvidas, causando reações de hiperplasia de células reticulares dos órgãos linfóides com infiltração de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, assim como a formação de granulomas. Existem lesões que são consideradas típicas da infecção por *B. canis*, dentre elas estão a meningite e encefalite não supurativa. São incluídos nas lesões post-mortem linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, qualquer outro órgão pode estar envolvido, as placas de peyer estarão afetadas, e poderá ocorrer infiltração de neutrófilos e vulvite. Nos machos as lesões mais comumente encontradas são orquite, epididimite, dermatite escrotal, infiltração linfocitária na próstata, com destruição do tecido glandular, degeneração dos túbulos seminíferos com espermatogônias e células de sertoli no lúmen, em casos mais severos há perda de túbulos seminíferos, os quais podem ser substituídos por tecido conjuntivo fibroso (CARMICHEL; KENNEY, 1968).

Nas fêmeas apresentam hipertrofia glandular do útero com infiltração da lâmina própria por linfócitos e formação de granulomas, com infiltração de

neutrófilos. Restos de placenta podem permanecer no útero, apresentando necrose focal coagulativa das vilosidades coriônicas (RAMÍREZ, 2006).

Os fetos apresentam-se congestos e com hemorragia em diferentes órgãos, acumulação perivascular de linfócitos no fígado (ORDUNÃ *et al.*, 2001). A placenta e o feto apresentam autólise (NELSON E COUTO, 1995). Outras lesões que são observadas em fetos abortados é broncopneumonia, miocardite, hemorragias focais nos rins, com infiltração linfocitária e células em seu interestício e tecido perivascular da pelve renal, linfadenite e hepatite (RAMÍREZ, 2006; BRISENÔ *et al.*, 2004).

### 3.11 TRATAMENTO

O tratamento de *B. canis* requer o uso de diversos tipos de antimicrobianos. São utilizadas combinações para combater a infecção. Tetraciclina e gentamicina tem sido utilizadas 2 a 3 vezes ao dia por um a dois meses (HOLLETT, 2006). Outros medicamentos também são utilizados de maneira combinada no controle a infecção ocular. As melhores escolhas de combinação tem sido gentamicina, ciprofloxacina, doxiciclina e rifampicina ou doxiciclina, enrofloxacina, rifampicina e estreptomicina (LEDBETTER, *et al.*, 2009).

Segundo Nelson e Couto (2010), a miociclina, tetraciclina, diidroestreptomicina, sulfadiazinatrimetoprima, gentamicina, doxiciclina, enrofloxacina, e várias combinações foram utilizadas no tratamento da *B. canis*. Porém, a maior parte dos cães que foram tratados permaneceu infectados, porque a bacteria se manteve no tecido prostático mesmo após terem sido utilizados diversos tratamentos, envolvendo diversas combinações de antimicrobianos. Normalmente as lesões causadas nos testículos são irreversíveis, e os cães ainda permanecem propensos a reinfecção.

Alguns trabalhos sugerem que a terapia seja feita juntamente com a castração, e que esses animais sejam acompanhados. Normalmente quando há laços afetivos o tratamento é feito, mas deve ser feito sobre avaliação do médico veterinário, onde irá avaliar cada situação. Em casos de animais de canil, deve ser

feito o isolamento, submetido aos testes confirmatórios, e se confirmado, devem ser eliminados do plantel(CARMICHAEL; GREENE, 1998).

### 3.12 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

Por se tratar de uma zoonose de importância, as medidas de controle de prevenção de Brucelose canina devem ser voltadas tanto para a população canina, quanto para a humana. Essas medidas requerem o monitoramento sorológico dos grupos específicos de indivíduos com maiores riscos de contrair a enfermidade, ou seja, as zonas epidemiológicas positivas para *B. canis* devem ser monitoradas, os animais positivos devem ser isolados, e eliminados. Deve ser feita os procedimentos adequados de higiene e desinfecção (LAING, 1991).

Animais utilizados para reprodução devem ser negativos para *B. canis*, evitando assim, a disseminação tanto na cópula, quando na inseminação artificial. A quarentena, o monitoramento e a eutanásia de cães infectados são métodos de controle primário para prevenção e eliminação de Brucelose canina em canis (HOLLETT, 2006).

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no município de Cruz das Almas, localizada na região do Recôncavo, no estado da Bahia, Brasil, tendo as seguintes coordenadas geográficas: 12° 40' 12" S de latitude e 39° 06' 07" W de longitude. Apresenta clima tropical com pluviosidade anual de 1136 mm, e temperatura média de 23,0°C. É limitado ao Norte com Governador Mangabeira, ao Sul com São Felipe, a oeste com Conceição do Almeida e Sapeaçu, e ao leste com São Félix. Fica a 146 quilômetros de Salvador, capital da Bahia (Figura 1). As amostras foram oriundas de bairros da região urbana e periurbana de Cruz das Almas.

**Figura 1** - Região do Recôncavo da Bahia



Fonte: <http://www.massapeimoveis.com.br/mapas.php>, 2015.

## 4.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram oriundas do banco de soro do Laboratório de Doenças Infeciosas do Hospital de Medicina veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, após a realização de um trabalho de conclusão de curso intitulado “Investigação da Leptospirose canina nos bairros Sapucaia e Tabela: Perfil epidemiológico”. Foram coletadas amostras de sangue canino do município de Cruz das Almas, sem distinção de idade, sexo e raça. A coleta de sangue foi feita pela punção da veia jugular ou cefálica, utilizando seringas de 3 e 5 ml, e agulhas 25x7, estéreis, antecipando-se ao processo, fez-se o uso de álcool a 70% para a antisepsia do local. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para extração do soro e mantidas refrigeradas. Foi feito a centrifugação a 3000 rpm para se obter soro após a refração do coágulo, acondicionado em tubos do tipo eppendorf e refrigerado a -20°C para posterior análise sorológica.

## 4.3 TÉCNICAS LABORATORIAIS

O teste sorológico foi baseado no trabalho de Maria Zoraida Daltro de Oliveira, cujo ponto de corte definido foi de 0,265.

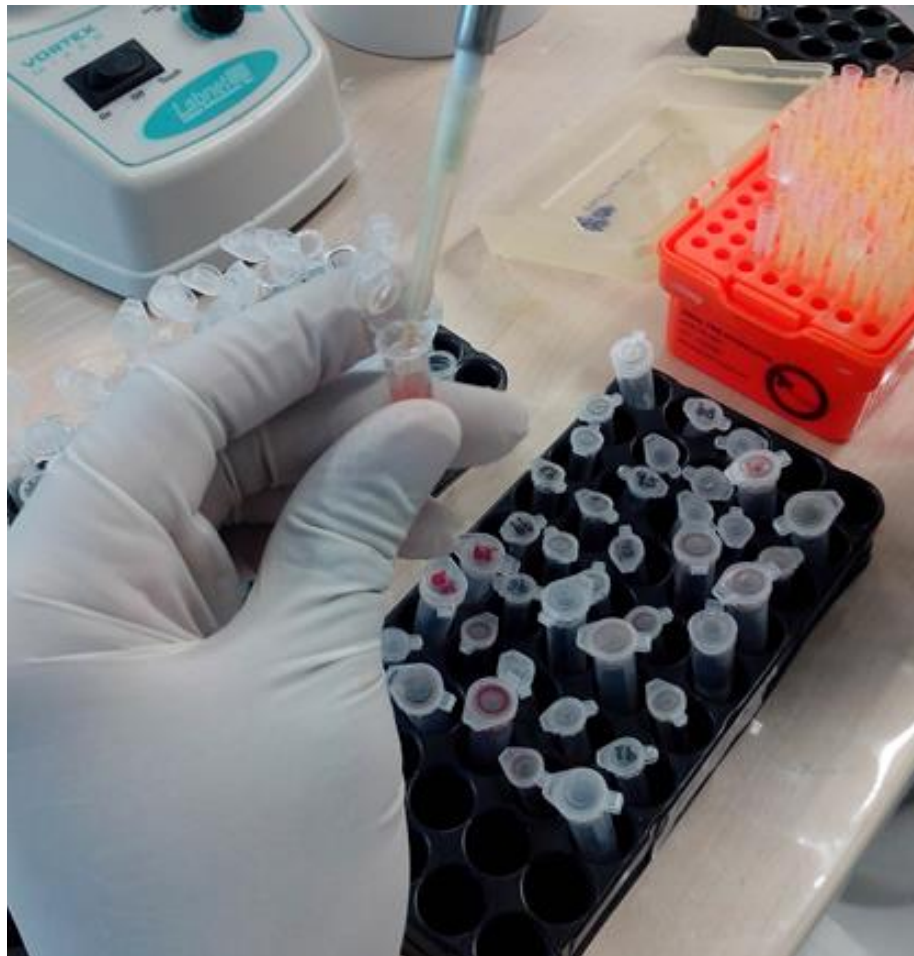
Para o ELISA indireto foram utilizadas microplacas de 96 poços, laboratório COSTAR®, o antígeno, foi diluído 1:100 em Tampão Carbonato Bicarbonato 0,05 M pH 9,6, do qual acrescentou-se 100 µL da diluição por poço para sensibilização, em seguida a placa foi mantida em câmara úmida em “*over night*” por 16 horas em temperatura de 04°C. Após esse período a placa foi lavada duas vezes com solução de PBS-T e iniciou-se o bloqueio com leite desnatado a 5%, adicionando 100 µL por poço da placa que foi levada dentro de uma câmara úmida para a estufa a 37°C, por duas horas.

Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada duas vezes com PBS-T. Procedeu-se a diluição do soro em leite desnatado a 1% em 50 ml de PBS-T na concentração de 1:1000, sendo 45 amostras testes, e utilizou-se como controles um



soro comprovadamente positivo e outro negativo, mediante o ponto de corte utilizado. Destas diluições foram adicionados 50  $\mu$ L e colocados em duplicata por poço. A placa foi levada para a estufa a 37° por 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T e em seguida, foi adicionado conjugado anti-IgG Dog na diluição 1:10.000 em PBS-T, transferindo-se 50  $\mu$ L desta diluição em cada poço, sendo levada para a estufa a 37°C por 1 hora. Transcorrido esse tempo, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T. Preparou-se a solução reveladora, na qual diluiu-se 4  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio, 4 mg de OPD (Ortosenilenodiamino), em 10 ml de tampão cítrico pH 5,1. Acrescentou-se 50  $\mu$ L dessa diluição em cada poço da placa que foi guardada sem exposição da luz para revelação em 15-20 minutos. Após esse tempo interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N e realizou-se a leitura da placa em leitor de Elisa ASYS Expert Plus® filtro de 490 nm.

**Figura 2** -Diluição do soro



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 3 - Estufa DBO**



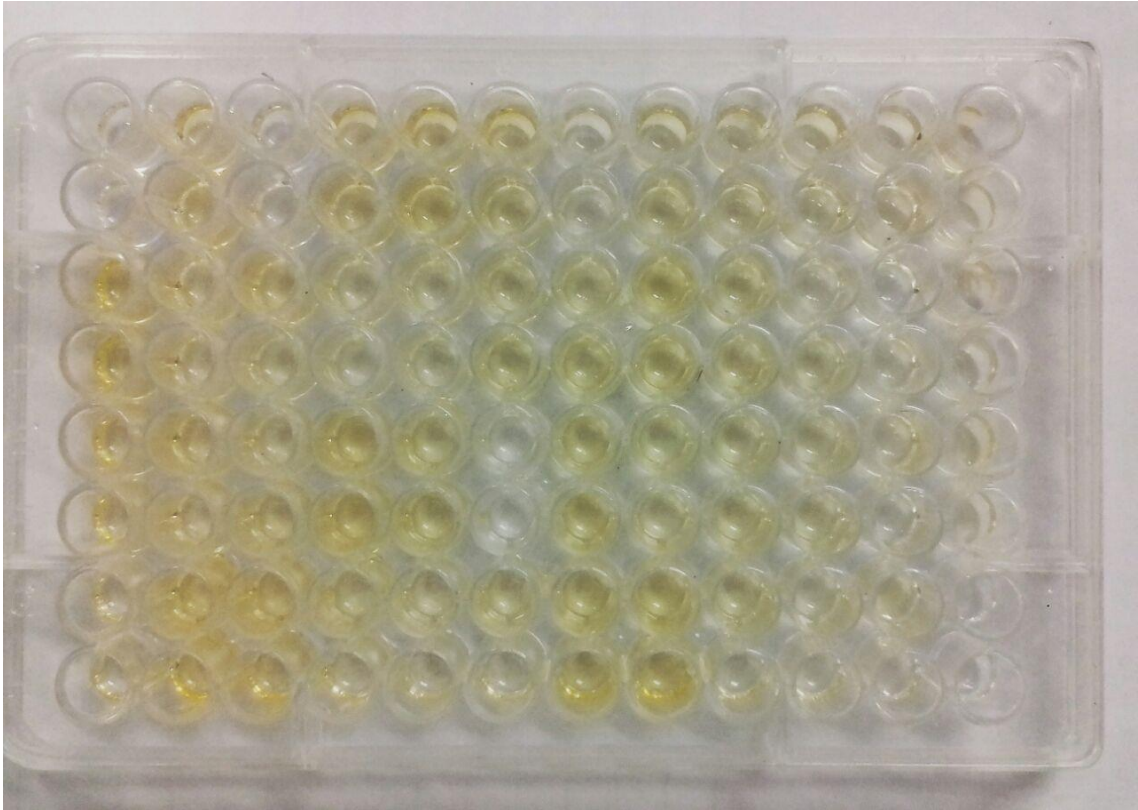
Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 4 -Leitora de microplacas**



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 5** -Placa de 96 poços



**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.4 ESTUDO ESTATÍSTICO

As informações obtidas foram tabulados no software do Excel v. 2010 Microsoft, para posteriormente ser feito o estudo estatístico de frequência e média, bem como a identificação dos animais positivos e negativos, mediante o ponto de corte que foi utilizado.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados um total de 250 amostras de cães domiciliados e semi domiciliados do município de Cruz das Almas, Bahia, como ponto de corte “*Cut off*” do no teste do ELISA indireto, foi estimado o valor de absorbância de 0,265 (OLIVEIRA, 2011), o desvio padrão calculado foi de 0,0754, sendo considerado positivo ao teste um total de 66 amostras e 184 foram negativas, obtendo-se uma prevalência de 26,4%.

Esse percentual de prevalência corrobora com os achados de Oliveira (2011), onde foi determinada uma prevalência de 23,2 % de cães semi domiciliados e de Ribeiro (2003) com prevalência de 24%, em soros de cães domiciliados.

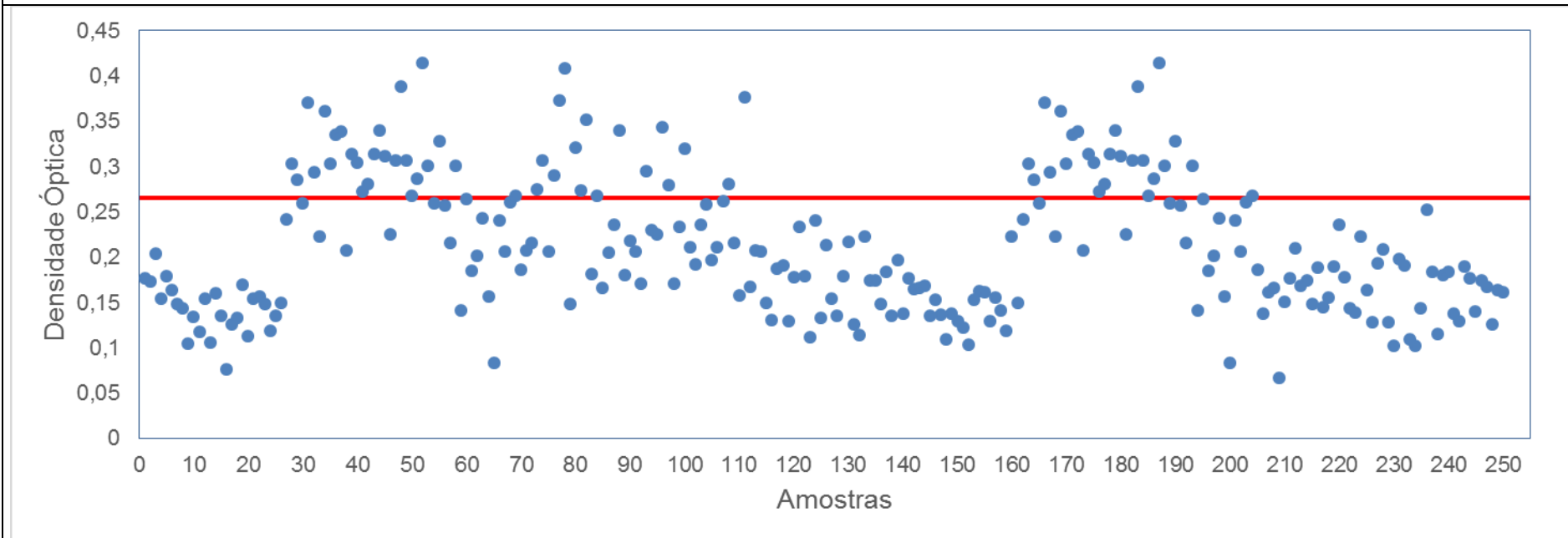
A soroprevalência demonstrada mostrou-se semelhante aos resultados achados por Amarante e Silva *et. al.* (2012), que observou a presença de *B. canis* em 79 dos 329 animais estudados (24,1%).

No país, sobretudo na região Nordeste, poucos estudos têm sido realizados para determinar a prevalência de *B. canis* utilizando o ELISA, bem como outras técnicas sorológicas, mesmo com o aumento nos índices. Que são observados na região Sul e Sudeste (OLIVEIRA, 2011).

Larsson e colaboradores (1981), em São Paulo, examinaram amostras de sangue de 364 cães, dentre estes 164 de canis foi constatado uma prevalência de de 9,1 %, os outros cães que eram de rua tiveram uma prevalência de 7,5%. Germano *et.al* (1987) realizaram inquéritos sorológicos durante uma campanha de vacinação em Campinas, SP. De 352 amostras de cães que fizeram o teste de aglutinação em placa, 5,4% foram positivos para *B.canis*

No ano de 2015, Tavares utilizando 400 amostras de soro de cães para detectar *B.canis*. Destes, 60 amostras foram considerados positivos, com uma prevalência de 15%. Para o diagnóstico foi utilizado um kit comercial que utiliza a técnica de imunoensaio cromatográfico.

**Figura 6 – Soroprevalência de animais positivos e negativos. Os pontos corados em azul que estão acima da faixa vermelha são considerados positivos. Os pontos que se encontram abaixo da linha, são considerados negativos.**



**Fonte:** Arquivo pessoal.

## 6.0 CONCLUSÃO

O diagnóstico da *Brucella canis* torna-se difícil devido à pouca especificidade do diagnóstico clínico. Sendo assim, é necessário utilizar métodos de diagnósticos não apenas sorológicos. O PCR, e o isolamento do agente em cultivo, e consequentemente sua identificação, são testes muito eficazes no que diz respeito a elucidação do diagnóstico da Brucelose canina.

A prevalência encontrada no estudo sorológico está sujeita a diversos tipos de alterações, dentre elas, a reação cruzada, podendo causar resultado falso-positivo. Sendo assim, é necessária a utilização de outros métodos diagnósticos para comprovação da presença de anticorpos contra o agente infeccioso. O soroaglutinação lenta, a soroaglutinação rápida e a Imunodifusão em gel de ágar também são considerados boas técnicas de diagnóstico.

Todavia, casos assintomáticos, e subnotificados podem acontecer. Uma vez que ainda não é comum realizar testes para detectar *B.canis*. A população canina de Cruz das Almas está crescendo, e o número de animais errantes, e semi domiciliados estão aumentando. Essas condições expõe a população humana e canina a um risco de infecção pelo referido agente.

Os cães infectados tornam-se uma fonte de infecção e disseminação para outros indivíduos, e o homem. Essa contaminação acontece, devido ao convívio próximo entre o homem, e o cão, e/ou pelo tratamento não eficaz.

O tratamento não é aconselhado, mas vai depender, entre outros fatores, do critério do médico veterinário, que também é responsável por informar aos proprietários sobre o potencial zoonótico da infecção.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1-10, 2005.
- AMARANTE e SILVA, C. P.; ALMEIDA, A. B. P.; GODOY, I.; ARAÚJO, A. C. P.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F.; NAKAZAKO, L.; DUTRA, V. Detecção molecular da *Brucella canis* em cães do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1051-1056, 2012.
- AZEVEDO, S.S.; *et al.* Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 106-12, 2004.
- AZEVEDO, S.S.; *et al.* Brucelose Canina por *Brucella canis*. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n. 31, p. 39-46, jan/fev. 2004.
- AZEVEDO, S.; *et al.* Inquérito sorológico e fatores de risco para brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana do Parnaíba, estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, p.156-60, out - dez 2003.
- BALDI, P.C.; *et al.* *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 127-34, 1994.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Austin: Texas A&M University Press College Station, 1994. p.1053-66.
- BRISENO, H.; PARAMO, R.; FLORES, R.; SUAREZ, F. 2004. Problemas reprodutivos en perros infectados com *Brucella canis*. **Vet. Mex.** 35(2): 121-28p.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. 1968. Canine abortion caused by *Brucella canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**. V. 152(6): 605-16.
- CARMICHAEL, L.E. Abortion in 200 beagles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 8, p.1126, 966.
- CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan, J.R (Ed.). **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p.335-50, 1990.
- CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, v. 6, p. 106-16, 1976.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Brucellosis canina. In: CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. **Enfermedades Infecciosas Perros y Gatos**. México, Interamericana: Mcgraw-Hill, 1993, p. 604-15.

CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis In GREENE, C. E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: **W. B. Saunders Company**, 1990, p. 573-84.

CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In. Greene CE. Infectious diseases of the dog and the cat. Philadelphia: **W. B. Saunders**, 1998, p. 248-57.

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

CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, p. 1726-34, 1970.

CARMICHAEL, L.E.; SHIN, S.J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, v. 11, p. 161-165, 1996.

CARMICHAEL, L.; GREENE, C.E., Canine brucellosis.In: GREENE, C.E. (ed.). Infectious diseases of the dog and cat.2. ed. Philadelphia: **W.B. Sanders**, p. 248-257, 1998.

CARMICHAEL, L.; GREENE, C.E., Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. (ed.). Infectious diseases of the dog and cat.2. ed. Philadelphia: **W.B. Sanders**, p. 248-57, 1998.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. São Paulo: Medsi, 2. ed. Rio de Janeiro: **Meds**i, 1992. cap. 20, p. 195-215.

COTRINO, V., CASTILLO, V., MORENO, C. 2003.**Encuestaserologica sobre *Brucella canis* en pacientes atendidos enla clinica de pequenos animalesenlaFacultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de laUniversidad Nacional de Colômbia.**

COUTO, C.G.; NELSON, R.W. Infecções genitais e tumor venéreo transmissível. In: Medicina interna de pequenos animais,2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 726-727, 2001.

CRESPO, F. 1994. BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA. **Ed. Office International de Epizooties**, Paris, Francia. ISBN 92-9044-342-1.

DIAZ, R.; JONES, L.; WILSON, J.B. 1968. Antigen relationship of the gram negative organism causing canine abortion to smooth and rouge Brucellae.**J Bacteriology** 95: 618-24p.

DZIEZYC, J. Canine systemic bacterial infections.**Veterinary Clinics of North America**.Small Animal Practice,v. 30, n. 5, p. 1103-17, 2000.



FLORES, R., CARMICHAEL, L.M. 1981.Brucelosis causada por *Brucella canis*. **CienciaMedica**. (3): 21p.

GEORGE, L.W.; DUNCAN, J.R.; CARMICHAEL, L.E. Sêmen examination in dogs with canine brucellosis.**American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 11, p. 1589-95, 1979.

GERMANO, P.M.; *et al.* **Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas – SP, Brasil**.Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v. 24, n. 1, p. 27-34, 1987.

GODOY, A.M.; *et al.* **Isolamento de *Brucella canis*, em Minas Gerais, Brasil**.Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, v. 29, n. 1, p. 35-42, 1977.

GOMES, M. *Brucella* spp. Rio Grande do Sul: 2007. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/brucella.pdf> **Acesso em: 15 set. 2007.**

GOMES, M; *et al.* *Brucella canis*: isolamento em um cão com epididimite e orquite – Relato de Caso. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 18, p. 17-20, jan/fev. 1999.

GONZALES, H.; RAMIREZ, R.; FLORES, R.; SUAREZ, F. 2004.Reproductive problems in male dogs infected with *Brucellacanis*.

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

HOLLETT, B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v.66, p.575-87, 2006.

JAWETZ, M. Microbiologia Médica. **Editora Guanabara Koogan**, 21<sup>a</sup> ed, p. 199-200, 2000.

JOHNSON, C.A.; W ALKER, R.D. **Clinical signs and diagnosis of *Brucellacanis*infectio**.The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarinary Small Animal, v. 14, n. 6, p. 763-72, 1992.

JONES M.L.; BRINLEY W.J. 1958.Informe preliminar sobre unmediosselectivo para el cultivo de brucelas, inclusive de tipo aberrante. **BulletinoftheWodd Health Organization**. V.19 (1): 361-4p.

KEID, L.B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos no diagnostico da brucelose em cães naturalmente infectados**. 2006.134p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses - Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

KIRK R. 1997. Therapeuticaveterinaria de pequenos animales XII. **Editorial McGraw Hill Interamericana**, Mexico. 1177-1181p.

KONEMAN, E.W.; *et al.* Bacilos Gram-negativos exigentes in: **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 8, p. 441-7.

LAING J. 1991. Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. **Editorial Interamericana Mc- Graw Hill**. Espana. 201-234, 283-4p.

LARSSON, M.H.; *et al.* Pesquisa de Aglutininas anti *Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 14, p. 404-7, 1980.

LARSSON, M. H. M. A.; LARSSON, C. E.; MIRANDOLA, R. M. S.; YASUDA, P. H.; GRUTOLLA, G. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. **International Journal of Zoonoses**, v. 8, p. 85-90, 1981.

LEDBETTER, E.C.; *et al.* *Brucellacanis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis and treatment. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 3, p. 183-91, 2009.

LUCERO N.E., ESCOBAR G.I., AYALA S.M., JACOB N. 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucellacanis*. **J Med Microbiol** 54(Pt 5): 457-61p.

LUCERO, N.E. *et al.* Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucellacanis* infection in dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 656-60, 2002.

MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; MARTÍN, M.; SOLER, M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucellacanis* for diagnosis of brucellosis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1043-6, 1993.

MEGID, J; *et al.* Brucelose Canina: Relato de Caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 103-6, out/dez. 2002.

MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J. Brucelose. In: COURA, J.R. (Comp.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2005. Cap. 128, p. 1529-38.

MOORE, J.A. *Brucellacanis* infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 12, p. 2034-7, 1969.

MOORE, J.A.; KAKUK, T.J. Male dogs naturally infected with *Brucellacanis*. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 8, p. 1352-8, 1969.

MORIYON I, MORENO E, CLOECKART A. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. **Int. Microbiology Veterinary** (90): 209-27.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Elsevier: São Paulo. 2010, p.936-8.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. ed. Elsevier: São Paulo. 1995 P. 665-9.

OLIVEIRA, M. Z. D. *et al.* Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucellacanis*. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 425-31, 2011.

ORDUNA, A.; ALMARAZ, A.; PRADO, A.; GUTIERREZ, M.P.; GARCIA-PASCUAL, A.; DUENAS, A.; CUERVO, M.; ABAD, R.; HERNANDEZ, B.; LORENZO, B.; BRATOS, M.A.; RODRIGUEZ, A. 2001. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for the seodiagnosis of human brucellosis. **J. Clin Microbiol.** V. 38. 4000-5p.

PACHECO, C.; MELLO, M.T. **Brucelose**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 127p. 1956.

PERES, J. N. *et al.* O. **Isolamento de *Brucella canis* de carrapatos** (Rhipicephalussanguineus). Arq. da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, v.33, p. 51-5, 1981.

PREFEITURA DE CRUZ DAS ALMAS. Histórico de cruz das almas. Disponível em <<http://www.cruzdascalmas.ba.gov.br/cidade>> **Acessado em out. 2015.**

PURVIS, D.S. Isolatim of *Brucellacanis* from canine with pyogranulomatous dermatitis. In: **Abstracts of the 81 st. Annual Meeting of the American Society for Microbiology**, p.309, 1981.

RAMIREZ H. 2006. Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao. **Rev Inv Vet Peru**; 17(1): 39-43.

RIBEIRO, M.B. **Evaluation of immunoreactivity of canine sera the two soluble extracts of *Brucellacanis*. 66 pp. ill. 2003.** Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003. 67 p

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

SAEGUSA, J. *et al.* Ocular lesions in experimental canine brucellosis. **Jpn. J. Vet. Sci.** n. 39, p. 181-5, 1977.

SCHOEB, T.R.; MORTON, R. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 172, p. 598-600, 1978.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 41, n. 6, p. 607-16, 1979.

SERIKAWA, T. *et al.* Head to head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucelacanis* infection. **Jpn. J. vet. Sci.**, v. 46, p. 41 -8, 1984.

SOUZA, L. A; *et al.* Prevalência de Infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte – MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 24, n. 3, 2002.

TAVARES, D.C. Transtornos reprodutivos causados por agentes infecciosos em animais de canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto. **Tese (Doutorado)** Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias estado de São Paulo./ Denise Claudia Tavares- Jaboticabal, 2015 75 p.

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

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

WANKE, M.M.; DELPINO, M.V.; BALDI, P.C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 367-75, 2002.

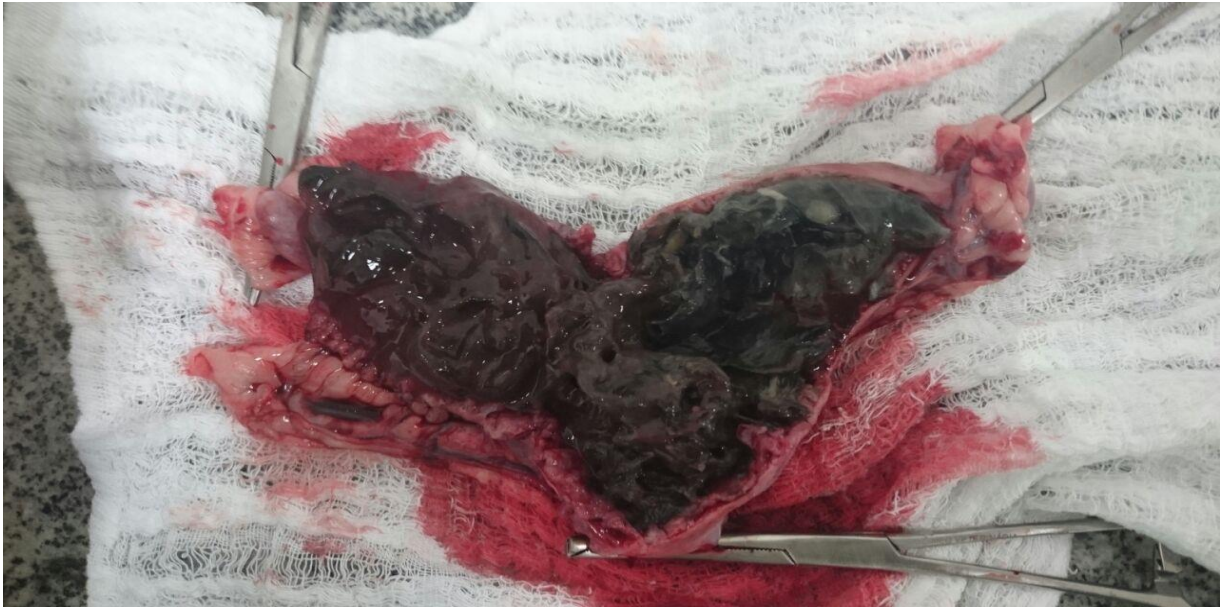
WEBER, A.; CHRISTOPH, H. Untersuchungen von *Brucellacanis* bei Hunden. **Fortschr. Veterinarmed**, v. 35, p. 351-55, 1982.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. CORBEL, M.J. (Org.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: World Health Organization, 2006. 102 p.

ZORAIDA, M.D.O. **Validação de um teste Elisa indireto para sorodiagnóstico de Brucelose canina e sua aplicação em um estudo de soroprevalência em cães da região metropolitana de Salvador**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2008. 84 p

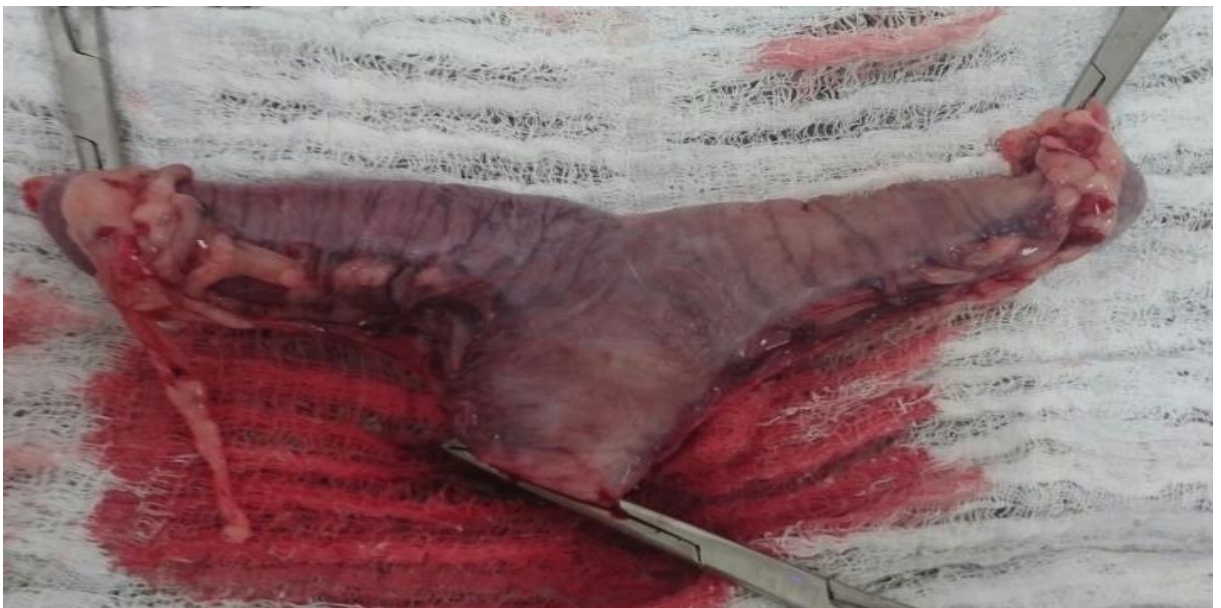
## ANEXOS

**Figura 7 - Fetos macerados**



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 8 - Útero de cadela**



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 9** – Testículo de cachorro.



**Fonte:** Trabalho de conclusão de curso. *Brucella canis*: Sua importância no Brasil. Paula Milano Hespagnol.

**Figura 10** - Demonstração da *Brucella canis* pela coloração de Gram.



**Fonte:** Revista CFMV- nº 31 - Janeiro/Fevereiro/Março/Abril de 2004.

**Figura 11** -Orquite e epididimite causada por *Brucella canis*.



Fonte: [www.cfmv.orq.br/rev31/tecnic12.htm](http://www.cfmv.orq.br/rev31/tecnic12.htm).