

Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias

Canine brucellosis diagnosis: pitfalls and strategies

Sílvia Minharro^{1,2}, Ana Claudia Pinto Cottorello¹, Karina Leite Miranda¹, Ana Paula Reinato Styne¹,
Telma Maria Alves¹, Andrey Pereira Lage^{1*}

¹Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO.

Correspondência: alage@vet.umfg.br

Resumo

Os cães de companhia apresentam hoje uma inserção muito grande na sociedade, o que gera preocupação em relação à sanidade desses animais. Nesse contexto, atenção deve ser dada à brucelose canina, doença prevalente no Brasil, que acarreta problemas reprodutivos em machos e fêmeas, prejuízos ao criador de cães e ainda causa importante zoonose. Para controle e erradicação da brucelose canina dos criatórios, é fundamental a implementação de um correto diagnóstico. No entanto, grandes dificuldades existem em relação ao diagnóstico da brucelose canina no Brasil. O objetivo deste trabalho foi discutir as técnicas de diagnóstico disponíveis, em função de suas vantagens, desvantagens e dificuldades, e delinear estratégias para aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico da brucelose canina.

Palavras-chave: brucelose canina, *Brucella canis*, diagnóstico.

Abstract

At the present time, dogs play a real important role in our society as companion animals, what raises lot of concerns on their health. In such context, attention should be given to canine brucellosis, a frequent disease in Brazil, which causes reproductive problems in male and females dogs, economic losses to dog breeders and an important zoonosis. For the control and eradication of canine brucellosis, the establishment of the exact diagnosis is of utmost importance. However, lots of difficulties and pitfalls are reported in the diagnosis of canine brucellosis in Brazil. The aim of the present review was to discuss the available diagnostic techniques, their advantages, disadvantages and pitfalls, and to design diagnostic strategies to increase the sensitivity and specificity of the diagnosis of canine brucellosis.

Keywords: canine brucellosis, *Brucella canis*, diagnosis.

Introdução

Os animais de companhia ocupam nos dias de hoje, uma importante posição na sociedade. Além da companhia para crianças, idosos ou para toda a família, podem desempenhar funções como cães-guia para cegos e cães de guarda. Isso faz com que a indústria de produtos para pequenos animais cresça vertiginosamente a cada ano. Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (2005) mostram, no ano de 2004, um movimento superior a 192 milhões de reais em produtos para animais de pequeno porte.

A crescente importância conferida pela sociedade aos animais de companhia, faz com que grande atenção seja dispensada à sanidade desses animais. Dentre as doenças que podem causar problemas reprodutivos em machos e fêmeas, destaca-se a brucelose canina, zoonose que acarreta grandes prejuízos ao criador de cães.

A brucelose em cães causada pela *Brucella canis* é uma doença contagiosa, transmitida por via sexual ou por via oral, caracterizada principalmente por abortos no terço final da gestação, geralmente após os 45 dias. Essa característica reprodutiva da brucelose canina a torna importante em cães utilizados para reprodução, visto que muitos animais não apresentam sinais aparentes que levem o proprietário a suspeitar que os mesmos estejam estão doentes (Carmichael, 1990; Shin e Carmichael, 1999).

A *B. canis* parasita um limitado número de espécies. Cães domésticos e canídeos selvagens são os mais susceptíveis. Gatos têm sido infectados experimentalmente, mas são relativamente resistentes, apresentando uma bacteremia transitória. Existem casos humanos por contato com cães infectados ou contaminação laboratorial (Carmichael e Greene, 1998).

A brucelose canina já foi constatada na América, Europa, Ásia e África (Carmichael, 1990). No Brasil, estudos sorológicos em cães demonstraram frequência de infecção por *B. canis* entre 0,84% (Moraes *et al.*, 2002) e 58,3% (Ferreira *et al.*, 2003). Esses dados não devem ser diretamente comparados por haver grandes diferenças no delineamento amostral. Os estudos variavam de um canil com animais infectados a levantamentos de prevalência

em animais de companhia ou animais errantes (Miranda *et al.*, 2005).

A importância dos trabalhos de prevalência está na evidência de que a infecção por *B. canis* está disseminada no país. Isto alerta para a necessidade de se impedir a entrada da brucelose canina em um plantel e de se identificar precocemente os animais infectados, principalmente quando houver histórico de fêmeas que abortaram no terço final de gestação ou de animais com baixo desempenho reprodutivo, para diminuir as perdas econômicas e evitar a infecção humana.

O correto diagnóstico da infecção por *B. canis* é fundamental para que o controle e a manutenção de animal ou canil livre da doença ocorram. Entretanto, a brucelose canina não é freqüentemente diagnosticada por causa das dificuldades encontradas nesse diagnóstico.

Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da infecção por *B. canis* apresenta várias dificuldades. Nos primeiros estágios, os animais infectados podem não apresentar sinais clínicos da doença ou esses podem não ser claramente identificados. Os sinais clínicos apresentados por animais acometidos não são patognomônicos, podendo estar presentes em uma grande variedade de doenças. Os animais apresentam prolongada bacteremia sem febre, que pode durar anos; perda no brilho do pêlo, linfadenopatia generalizada e inapetência podem ser notadas em alguns animais (Carmichael e Greene, 1990).

Os sinais clínicos mais evidentes no macho são epididimite e prostatite. Em função da dor causada pela epididimite, os animais lambem com freqüência o escroto, desenvolvendo uma dermatite escrotal, que pode vir a ser contaminada por *Staphylococcus aureus*. A orquite não é freqüente na infecção por *B. canis*, mas eventualmente pode ocorrer. Com o progresso da doença, pode ocorrer atrofia testicular e ocasionalmente esterilidade. Em cães infectados por mais de cinco semanas, ocorre decréscimo do volume seminal e ejaculação dolorosa, mas a libido não é alterada (George *et al.*, 1979).

Alterações espermáticas começam a aparecer no ejaculado por volta da quarta semana de infecção e consistem principalmente de peça intermediária edemaciada e presença de gotas citoplasmáticas distais. Cauda enrolada e refração acrossomal podem ocorrer com menor freqüência. Com oito semanas de infecção, as anormalidades espermáticas tornam-se mais severas e incluem cauda fortemente enrolada, destacamento de cabeça, peça intermediária dobrada e acrossomas deformados. Nesta fase, a motilidade espermática é fortemente reduzida, chegando a apenas 10% de espermatozóides móveis. Aglutinações espermáticas estão presentes a partir de 12 semanas de infecção e ocorrem porque os animais desenvolvem uma resposta auto-imune, produzindo anticorpos contra os espermatozóides (George *et al.*, 1979). Essas lesões causadas pela *B. canis* no sistema reprodutivo dos machos fazem com que o prognóstico reprodutivo dos animais acometidos pela doença seja altamente desfavorável.

Nas fêmeas, abortos no terço final de gestação, que podem apresentar prolongada descarga vaginal amarronzada, são altamente sugestivos de infecção por *B. canis*. As fêmeas dão a luz a filhotes fracos que podem morrer poucos dias após o parto. Morte embrionária precoce com reabsorção pode ocorrer e é interpretada como falha na concepção (Wanke, 2004).

Em função das dificuldades e da baixa especificidade do diagnóstico clínico, a confirmação do diagnóstico de brucelose canina deve ser realizada por métodos laboratoriais.

Diagnóstico sorológico

A sorologia é bastante empregada no diagnóstico da brucelose canina. Como em qualquer doença, a primeira classe de anticorpos a aparecer após a infecção é a IgM, portanto sua presença no soro indica infecção recente. Em seguida, aparecem as IgG, que permanecem por longos períodos, principalmente em infecções crônicas. Como a brucelose canina é uma doença crônica, a principal imunoglobulina a ser detectada pelos testes diagnósticos é a IgG. Apesar de ser a metodologia mais difundida de diagnóstico da brucelose canina, a sorologia apresenta muitos problemas em nosso meio, principalmente ligados à disponibilidade de antígenos e kits para o diagnóstico sorológico.

A *B. canis* não possui a cadeia O do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular completa, formando colônias de morfologia rugosa e de aspecto mucóide (Alton *et al.*, 1988). Assim, os antígenos preparados com amostras lisas de *Brucella*, como a *B. abortus* para diagnóstico da brucelose bovina, não são capazes de detectar anticorpos anti-*B. canis*, sendo necessária a utilização de antígenos preparados com amostras rugosas de *Brucella* sp., *B. canis* ou *B. ovis*, para o diagnóstico da brucelose canina (Carmichael, 1990).

A primeira prova sorológica descrita foi a aglutinação em tubo (Moore e Bennett, 1967), posteriormente modificada por Badakhsh *et al.* (1982) para a aglutinação rápida em placa utilizando o 2- mercaptoetanol (2ME), e melhorada por Carmichael e Joubert (1988) com o emprego de uma amostra não mucóide (M-) de *B. canis* na produção do antígeno.

Os testes que detectam anticorpos contra antígenos de superfície são a soroaglutinação rápida em lâmina (SAR) e soroaglutinação lenta em tubo (SAL) (Johnson e Walker, 1992). Ambos são testes sensíveis e detectam animais recentemente infectados, sendo indicados para procedimentos de triagem (Johnson e Walker, 1992; Carmichael e Shin, 1996).

A SAR é o teste sorológico mais comumente utilizado na triagem das infecções por *B. canis*. É um teste barato, rápido e de fácil execução, podendo ser realizado em qualquer clínica veterinária (Carmichael e Shin, 1996). Apresenta muitas vantagens sobre os outros testes, incluindo a precocidade no diagnóstico, pois já revela anticorpos a partir de três a quatro semanas da infecção (Carmichael e Greene, 1998).

Na SAR é utilizado um antígeno elaborado com a *B. ovis* corado com rosa de bengala. Porém, os resultados positivos devem ser interpretados com cautela, pois uma proporção significativa de resultados falso-positivos pode ocorrer nesse teste (George e Carmichael, 1978). Esse teste apresenta boa sensibilidade, mas a especificidade é muito baixa, ou seja, o resultado negativo é uma forte evidência de que o animal não está infectado, mas apenas 50% dos animais cujos soros apresentam aglutinação são realmente positivos. Logo, animais positivos na SAR não podem ser considerados infectados antes de serem submetidos a um teste confirmatório.

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. O 2ME desnatura a IgM pela destruição das pontes dissulfídicas, minimizando, assim, as ligações inespecíficas. (Johnson e Walker, 1992; Carmichael e Shin, 1996). Apesar de mais específicos, esses testes não devem ser considerados como testes confirmatórios (Johnson e Walker, 1992; Carmichael, 1998).

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, por sua vez, é o teste sorológico clássico para o diagnóstico da brucelose canina. Fornece os resultados em título (semiquantitativo) e muitas vezes é utilizada para a confirmação da SAR-2ME (Carmichael, 1998). A SAL é menos sensível e um pouco mais específica que a SAR (Johnson e Walker, 1992). Assim, pode-se indicar a utilização deste método para quantificar e monitorar a resposta sorológica de cães infectados e tratados (Johnson e Walker, 1992, Carmichael e Greene, 1990).

A maioria das investigações nos Estados Unidos da América sugere que um título de 100 na soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol (SAL-2ME) é indicativo da infecção por *B. canis* (George e Carmichael, 1984). Todavia, Carmichael e Greene (1998) relatam que títulos de até 50 devem ser considerados negativos ou em início de infecção (cerca de duas a três semanas); entre 50 e 100 são considerados suspeitos e devem ser retestados 30 dias após; e quando forem iguais ou superiores a 200 são positivos.

Outro teste sorológico empregado para o diagnóstico da brucelose por *B. canis* é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Há 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; Carmichael, 1998; Carmichael e Greene, 1998).

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. Além desse fato, a interpretação do resultado é subjetiva, por esse não ser empregado como método quantitativo.

O teste de imunodifusão utilizando antígeno citoplasmático (IDGA – PC), atualmente, é o método mais específico para a detecção de *Brucella* sp rugosas. Utiliza extrato protéico do citoplasma bacteriano da *B. canis* (M-) e apresenta menor proporção de reações cruzadas. Uma grande vantagem da IDGA utilizando antígenos citoplasmáticos é a possibilidade de diagnosticar animais cronicamente infectados, permitindo a detecção de anticorpos circulantes até 36 meses após a bacteremia ter cessado quando outros testes apresentam resultados negativos (Johnson e Walker, 1992). Entretanto, em infecções recentes, o diagnóstico pela IDGA fica prejudicado, pois anticorpos circulantes são detectados somente a partir de 8 a 12 semanas após a infecção, ou seja, 4 semanas mais tarde do que a detecção pela SAL – 2ME (Johnson e Walker, 1992; Carmichael, 1998; Carmichael e Greene, 1998).

Em função de os antígenos citoplasmáticos serem comuns a outras espécies de *Brucella*, o IDGA – PC apresenta reações positivas quando as infecções são causadas por *B. suis*, *B. abortus* e *B. ovis*. No entanto, esse fato não é de grande interesse clínico, pois infecções por outras *Brucella* sp raramente ocorrem em cães (Barr *et al.*, 1986).

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).

Vários testes imunoenzimáticos, ELISA, têm sido desenvolvidos, utilizando tanto antígenos de parede de *B. canis* (Serikawa *et al.*, 1989) como antígenos citoplasmáticos de *B. abortus*, que são comuns a diversas espécies de *Brucella* (Baldi *et al.*, 1994). Estes últimos têm como vantagem não apresentarem reação cruzada com outras bactérias que não sejam do gênero *Brucella*. O ELISA indireto é altamente específico, mas menos sensível que a SAL para a triagem de cães infectados (Carmichael e Greene, 1998). Testes de ELISA indiretos de melhor sensibilidade foram obtidos com antígenos extraídos por solução salina aquecida (HSS) de amostra não mucóide de *B. canis* (variante M-) (Mateu-De-Antonio *et al.*, 1993). Testes de ELISA com antígenos purificados têm sido indicados como provas confirmatórias aos testes de triagem, em substituição às provas com 2ME ou gel difusão (Lucero *et al.*, 2002; Ebani *et al.*, 2003).

Outros testes sorológicos têm sido desenvolvidos, como a contra-imunoeletroforese, a imunofluorescência indireta e a fixação do complemento, mas, como são complexos, não são empregados na rotina dos laboratórios.

Diagnóstico bacteriológico

O isolamento e a identificação de *B. canis* é um método de alta especificidade diagnóstica, pois demonstra o agente etiológico da doença, mas sua sensibilidade pode ser baixa em função de vários parâmetros como eliminação intermitente da bactéria, material mal coletado e mal conservado, uso de antibióticos, etc.

A *B. canis* pode ser isolada de diversos tecidos e secreções, como sangue, linfonodos, baço, fígado, medula óssea, próstata, urina, sêmen, fetos abortados e secreções vaginais durante o estro, no pós-aborto e pós-parto (Carmichael, 1990). Amostras desses materiais devem ser coletadas da forma mais asséptica possível e colocadas em meio de transporte (Cary – Blair, Stuart) quando forem processadas no laboratório em poucas horas. Se o tempo entre a coleta e o processamento laboratorial for demorado, é melhor que as amostras sejam congeladas a -20°C até seu processamento laboratorial. Desta forma, é imprescindível que a temperatura de armazenamento seja mantida durante todo o tempo de transporte do material sob pena de perda de viabilidade da *B. canis* (Alton *et al.*, 1988; Carmichael, 1990).

É importante empregar procedimentos de segurança biológica no manuseio e na coleta de materiais suspeitos de infecção por *B. canis*, pois a brucelose canina é uma zoonose de transmissão por aerossóis, ingestão e contato com mucosas ou soluções de continuidade (Santos *et al.*, 2005). Desta forma, deve-se sempre utilizar material de proteção individual, como luvas, óculos, máscara, gorro e aventais, para se proteger da infecção. Os equipamentos utilizados na coleta ou nos restos de materiais contaminados devem ser desinfetados (hipoclorito de sódio a 2,5% por uma hora, formol a 5% por uma hora, cal a 15%) e descartados corretamente (autoclavação, incineração, enterramento em locais apropriados) (Russel *et al.*, 1984).

A *B. canis* cresce bem em aerobiose, em meios ricos convencionais utilizados para *Brucella* spp. Se os materiais estiverem muito contaminados, sugere-se o uso do meios enriquecidos com antibióticos (Alton *et al.*, 1988).

A confirmação do diagnóstico da infecção por *B. canis* pode ser estabelecida pelo isolamento e pela identificação da bactéria em tecidos e secreções (Johnson e Walker, 1992; Carmichael, 1998; Carmichael e Greene, 1998).

A cultura de sangue total é o material de eleição, na ausência de fetos abortados e de secreções vaginais, visto que a bacteremia permanece por longos períodos (Carmichael, 1990; Johnson e Walker, 1992). Os microrganismos são encontrados na fração leucocitária. Mais de 50% dos cães infectados apresentam uma bacteremia que dura um ou mais anos (Carmichael, 1998). A bacteremia pode ser detectada 2 a 4 semanas após a infecção e, não havendo tratamento do animal, pode persistir por até mais de 5 anos. A concentração de bactérias no sangue pode exceder 10^3 /mL (Carmichael, 1990).

A hemocultura, entretanto, não deve ser o único critério para diagnosticar a infecção, já que a bacteremia pode não estar presente na fase crônica da doença e requer um tempo mínimo de dez dias para a obtenção de resultados. Isso porque a bacteremia passa a ser intermitente e eventualmente diminui com a infecção crônica. Aos 58 meses de infecção, menos de 25% dos animais infectados apresentam hemocultura positiva (Johnson e Walker, 1992).

A hemocultura negativa, porém, não exclui a hipótese de infecção por *B. canis*, especialmente nos casos de infecção crônica, contudo a hemocultura positiva confirma o diagnóstico. Devido à localização intracelular em células do sistema mononuclear fagocitário, a bactéria pode ser recuperada a partir de aspirados de medula óssea na ausência de hemocultura positiva (Johnson e Walker, 1992).

Cultivos de material vaginal, coletados no período imediatamente após o aborto ou o parto, são de grande importância diagnóstica. *B. canis* pode ser isolada por várias semanas depois do aborto ou do parto. Da mesma forma, a bactéria pode ser isolada das secreções vaginais durante o estro.

Para os machos, o cultivo de sêmen normalmente produz números elevados de organismos de 3 a 11 semanas após a infecção. No entanto, a eliminação de *B. canis* pode ser intermitente, assim como baixas concentrações de bactérias podem ocorrer no sêmen, dificultando o isolamento a partir desse material. Com isso,

o diagnóstico bacteriológico passa a ser usualmente negativo nesse material (Carmichael, 1990; Carmichael e Greene, 1998).

A cultura de urina pode ser positiva de 8 a no mínimo 30 semanas após a infecção. A concentração urinária da *B. canis* varia de menos de 10 UFC/mL a 10⁵ UFC/mL de urina (Carmichael e Greene, 1990). Pode ser utilizado em alguns animais, principalmente machos, quando a hemocultura é negativa. No entanto, é necessário fazer a coleta da urina por cistocentese, para se evitar o crescimento exagerado de contaminantes.

Johnson e Walker (1992) citam que, em casos de uveíte causada por *B. canis*, o isolamento pode ser feito diretamente a partir do humor aquoso. A bactéria também já foi isolada de lesões como discoespondilite e osteomielite (Smeak *et al.*, 1987; Kerwin *et al.*, 1992). Em fêmeas gestantes ou na fase estral, pode-se isolar o agente de útero e placenta, além de fluidos vaginais e uterinos (Carmichael, 1990).

Estratégias de diagnóstico

O diagnóstico da brucelose canina é sempre um desafio a clínicos, criadores e laboratoristas. O primeiro passo no sentido de um diagnóstico correto da infecção por *B. canis* geralmente se inicia com as suspeitas clínicas. O histórico dos animais assim como do canil são de grande importância no suporte das suspeitas. Geralmente verificam-se no canil histórico de abortos no terço final de gestação, nascimento de cães fracos e que morrem logo a seguir, entrada ou cruzamento de animais sem diagnóstico livre de brucelose.

A partir da suspeição da doença fundamentada pelo histórico, deve-se submeter material dos animais suspeitos ao diagnóstico laboratorial. O material a ser submetido e o teste a ser solicitado vão depender da disponibilidade de antígenos e kits de diagnóstico pelos laboratórios. Essa disponibilidade de reagentes é um problema sério no Brasil, pois, oficialmente, nenhum antígeno ou kit está atualmente registrado para o diagnóstico de brucelose canina junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Barcelos e Moraes, 2005; informação verbal).

No entanto, vários laboratórios vêm empregando antígenos nacionais, produzidos com *B. ovis*, para IDGA, ou antígenos e kits importados para o diagnóstico de brucelose canina. Alguns poucos laboratórios ligados a universidades produzem antígenos de *B. canis* para a utilização em trabalhos de pesquisa.

Testes de IDGA com antígenos de *B. ovis* (Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, Curitiba, PR; Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF, Eldorado do Sul, RS) custam em torno de R\$ 12,00 por exame, e o resultado final é relatado após leitura com 72 horas.

Dentre os testes com antígenos e kits importados, os mais utilizados são o teste de aglutinação em lâmina com confirmação pela SAL, cujos preços variam de R\$ 35,00 a R\$ 70,00 por exame nas cidades de Belo Horizonte e São Paulo.

Em função de ser classificado como patógeno de nível de biossegurança 3, o isolamento de *B. canis* tem que ser realizado em laboratórios que possuam instalações para trabalho em nível de biossegurança 3 (Teixeira e Valle, 1996). Desta forma, somente poucos laboratórios têm condições de isolar *B. canis*. No geral, esses laboratórios estão ligados a instituições de pesquisa ou universidades.

Apesar de todas as dificuldades encontradas atualmente no diagnóstico da brucelose canina no Brasil, é possível se realizar o diagnóstico da doença com confiança. Para isto, devem ser empregadas estratégias diagnósticas que visem aumentar a sensibilidade da triagem e a especificidade do diagnóstico final.

Para se aumentar a sensibilidade do diagnóstico, pois há grandes problemas com a precocidade do diagnóstico e a sensibilidade individual dos testes, principalmente durante a triagem, pode-se empregar a estratégia da utilização de testes diagnósticos em paralelo, o que tende a maximizar a sensibilidade do diagnóstico (Tarabla, 2000). Isto pode ser conseguido pela utilização de dois ou mais testes sorológicos, por exemplo SAR e SAL ou SAR e ELISA, durante a triagem. Se o animal for reagente a um ou a outro teste, ele será considerado como positivo à triagem para brucelose canina. Esse tipo de estratégia visa diminuir o número de animais falso-negativos aos testes. Deve ser empregada principalmente quando se necessita de alta sensibilidade diagnóstica, como quando da introdução de animais em um canil ou do cruzamento de um animal livre da doença. Contudo, pode elevar o número de animais falso-positivos ao diagnóstico.

Uma das principais estratégias para o controle e a erradicação da brucelose canina é a identificação e o sacrifício ou a castração dos animais infectados (Miranda *et al.*, 2005). Para se evitar eliminar ou castrar animais falso – positivos, é necessário um esquema de diagnóstico de alta especificidade. Isto pode ser conseguido com o emprego de testes em série. Após a triagem, com o emprego de testes em paralelo ou não, realiza-se um outro teste confirmatório mais específico. Só será considerado como infectado o animal que for reagente positivo na triagem e no teste confirmatório. Essa estratégia maximiza a especificidade diagnóstica (Tarabla, 2000). Para tanto, pode-se empregar a triagem simples ou em paralelo com testes de aglutinação ou ELISA, e os animais reagentes na triagem devem ser avaliados por testes confirmatórios como os testes de SAL – 2ME, IDGA, ELISA indireto com antígenos purificados ou o isolamento e a identificação. Quanto mais específico for o teste confirmatório mais específico será o diagnóstico final. Dentre os testes mais específicos para o diagnóstico da



brucelose canina, estão o IDGA – PC, o ELISA indireto com antígenos purificados e o isolamento e a identificação.

No Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, o diagnóstico sorológico em conjunto com o diagnóstico bacteriológico vêm sendo utilizados para se aumentar a sensibilidade do diagnóstico da brucelose canina. Recentemente, *B. canis* foi identificada em tecidos coletados durante a necropsia de um cão e de um feto abortado. O cão foi identificado como reagente ao IDGA, utilizando-se antígeno de *B. ovis*. Posteriormente *B. canis* foi isolada do testículo desse animal. O feto de 45 dias apresentou *B. canis* em macerado de órgãos, mas cadelas desse canil tinham apresentado sorologia negativa ao IDGA com antígeno de *B. ovis*. Esses dados reforçam a importância do emprego de mais de uma técnica para maximizar a sensibilidade do diagnóstico da brucelose canina.

Sabe-se que pouco se tem feito para se controlar a brucelose canina de uma forma sistematizada no país, a não ser em alguns canis comerciais. Assim, muitos casos de infecção por *B. canis* não são relatados, principalmente por não ser exigida notificação obrigatória pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Desta forma, a vigilância deve ser realizada por todos os clínicos de pequenos animais e proprietários de cães e canis para se impedir que a doença acometa e se propague entre esses animais. Todos os animais destinados à reprodução devem ser livres da doença para se evitar sua disseminação, e todas as suspeitas de brucelose canina devem ser confirmadas para que se possa controlar essa doença.

Pode-se concluir que se deve fazer bom uso dos testes diagnósticos disponíveis, empregando-os conforme a situação epidemiológica e o objetivo do diagnóstico, para se obter altos níveis de sensibilidade e especificidade, e, assim, obter o controle e a erradicação da brucelose canina que tantos prejuízos podem trazer à cinofilia e à saúde humana.

Referências bibliográficas

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 190p.
- Badakhsh FF, Carmichael LE, Douglass JA. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. *J Clin Microbiol*, v.15, p.286-289, 1982.
- Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Fossati CA. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially usefull for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*, v.41, p.127-134, 1994.
- Barr SC, Eilts BE, Roy AF, Miller R. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, v.186, p.686-687, 1986.
- Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet*, v.78, p.63-73, 1988.
- Carmichael LE. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR. (Ed.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.335-350.
- Carmichael LE, Greene CE. Canine Brucellosis. In: Geene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.573-584.
- Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin Vet Med Surg Small Anim*, v.11, p.161-165, 1996.
- Carmichael LE. Brucelosis canina causada por *B. Canis*: enfermidade clínica; problemas en inmunodiagnóstico. *Rev Med Vet*, v.80, p.102-106, 1998.
- Carmichael LE, Greene CE. *Canine brucellosis*. In: Greene CE. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.248-257.
- Damp SC, Crumrine MH, Lewis GE Jr. Microtiter Plate Agglutination test for *Brucella canis* antibodies. *Applied Microbiol*, v.25.p.489-490, 1973.
- Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Bey RF, Andreani E. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiol*, v.26, p.65-73, 2003.
- Ferreira T, Gomes MPJ, Ronconi MA, Aquino MHC, Torres HM, Mandelbaum MA, Figueiredo MJ. Brucelose canina: ocorrência em um canil comercial. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.555-556, 2003.
- George LW, Carmichael LE. Development of a rose bengal-stained plate-test antigen for the rapid diagnostic of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet*, v.68, p.530-543, 1978.
- George LW, Carmichael LE. Antisperm response in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. *Am J Vet Res*, v.45, p.274-281, 1984.
- George LW, Duncan JR, Carmichael LE. Semen examination in dogs with canine brucellosis. *Am J Vet Res*, v.40, p.1589-1595, 1979.
- Johnson CA, Walker RD. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Comp Cont Educ Pract Vet Small Anim*, v.14, p.763-772, 1992.



- Kerwin SC, Lewis DD, Hribernik TN, Partington B, Hosgood G, Eilts BE.** Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). *J Am Vet Med Assoc*, v.201, p.1253-1257, 1992.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G.** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol*, v.51, p.656-660, 2002.
- Mateu-De-Antonio EM, Martín M, Soler M.** Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Vet Res*, v.54, p.1043-1046, 1993
- Miranda KL, Cotorello ACP, Poester FP, Lage AP.** Brucelose canina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.66-82, 2005.
- Moore JA, Bennet M.** A previously undescribed organism associated with canine abortion. *Vet Rec*, v.80, p.604-605, 1967.
- Moraes CCG, Megid J, Souza LC, Crocci AJ.** Prevalência de brucelose canina na microregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol*, v.69, p.7-10, 2002.
- Marassi CD, Moraes IA, Lilenbaum W.** Comparação entre antígenos de *B. canis* e de *B. ovis* para o diagnóstico da brucelose canina em testes de imunodifusão em Gel-agarose. *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.103-107, 2004.
- Russel AD, Yarnych VS, Koulikovskii AV.** (Ed). *Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases*. Geneva: World Health Organization, 1984. (WHO/VPH/84.4).
- Santos RL, Silva FL, Paixao TA, Samartino LE.** Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.83-98, 2005.
- Serikawa T, Iwaki S, Mori M, Muraguchi T, Yamda J.** Purification of *Brucella canis* cel wall antigen using immunosorbent assay for specific diagnosis of canine burcellosis. *J Clin Microbiol*, v.27, p.837-842, 1989.
- Shin S, Carmichael LE.** Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. 1999. In: Carmichael LE. (Ed.). *Recent advances in canine infectious disease*. New York: Internacional Veterinary Information Service, Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/ chapter_frm.asp ?LA=1>. Acesso em: 18 nov. 2005.
- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan).** Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sindan/>>. Acesso em: 18 nov. 2005.
- Smeak DD, Olmstead ML, Hohn RB.** *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. *J. Am Vet Med Assoc*, v.191, p.986-990, 1987.
- Tarabla H.** *Epidemiología diagnóstica*. Universidad Nacional del Litoral, 2000. 120p.
- Teixeira P, Valle S.** *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. 1996. FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 362p.
- Wanke MM.** Canine Brucellosis. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83, p.195-207, 2004.
-